

UNIVERSITE TOULOUSE III PAUL SABATIER

FACULTE DE SANTE

DEPARTEMENT DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

ANNEE : 2023

THESE 2023/TOU3/2108

THESE

POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement par

Laure BADIER

Née le 16 mars 1994 à Lyon (69)

RADIOMARQUAGE D'ANTICORPS : DE L'ETAT DE L'ART A LA MISE AU POINT DU RADIOMARQUAGE D'ANTICORPS AU CUIVRE 64 ET AU ZIRCONIUM 89

1^{er} décembre 2023

Directeur de thèse : Docteur Isabelle QUELVEN

JURY

Président : Professeur Philippe CESTAC
1^{er} assesseur : Docteur Isabelle QUELVEN
2^{ème} assesseur : Professeur Pierre PAYOUX
3^{ème} assesseur : Docteur Céline COLACIOS

PERSONNEL ENSEIGNANT
du Département des Sciences Pharmaceutiques
de la Faculté de santé
au 08 mars 2023

Professeurs Émérites

Mme BARRE A.	Biologie Cellulaire
M. BENOIST H.	Immunologie
Mme NEPVEU F.	Chimie analytique
Mme ROQUES C.	Bactériologie - Virologie
M. ROUGE P.	Biologie Cellulaire
M. SALLES B.	Toxicologie

Professeurs des Universités

Hospitalo-Universitaires

Mme AYYOUB M.	Immunologie
M. CESTAC P.	Pharmacie Clinique
M. CHATELUT E.	Pharmacologie
Mme DE MAS MANSAT V.	Hématologie
M. FAVRE G.	Biochimie
Mme GANDIA P.	Pharmacologie
M. PARINI A.	Physiologie
M. PASQUIER C.	Bactériologie - Virologie
Mme ROUSSIN A.	Pharmacologie
Mme SALLERIN B. (Directrice-adjointe)	Pharmacie Clinique
M. VALENTIN A.	Parasitologie

Universitaires

Mme BERNARDES-GENISSON V.	Chimie thérapeutique
Mme BOUTET E.	Toxicologie - Sémiologie
Mme COSTE A.	Parasitologie
Mme COUDERC B.	Biochimie
M. CUSSAC D. (Doyen-directeur)	Physiologie
Mme DERAËVE C.	Chimie Thérapeutique
M. FABRE N.	Pharmacognosie
Mme GIROD-FULLANA S.	Pharmacie Galénique
M. GUIARD B.	Pharmacologie
M. LETISSE F.	Chimie pharmaceutique
Mme MULLER-STAUMONT C.	Toxicologie - Sémiologie
Mme REYBIER-VUATTOUX K.	Chimie analytique
M. SEGUI B.	Biologie Cellulaire
Mme SIXOU S.	Biochimie
M. SOUCHARD J-P.	Chimie analytique
Mme TABOULET F.	Droit Pharmaceutique
Mme WHITE-KONING M.	Mathématiques

Maîtres de Conférences des Universités

Hospitalo-Universitaires

M. DELCOURT N.	Biochimie
Mme JUILLARD-CONDAT B.	Droit Pharmaceutique
Mme KELLER L.	Biochimie
M. PUISSET F.	Pharmacie Clinique
Mme ROUCH L.	Pharmacie Clinique
Mme ROUZAUD-LABORDE C	Pharmacie Clinique
Mme SALABERT A.S.	Biophysique
Mme SERONIE-VIVIEN S (*)	Biochimie
Mme THOMAS F. (*)	Pharmacologie

Universitaires

Mme ARELLANO C. (*)	Chimie Thérapeutique
Mme AUTHIER H.	Parasitologie
M. BERGE M. (*)	Bactériologie - Virologie
Mme BON C. (*)	Biophysique
M. BOUJILA J. (*)	Chimie Analytique
M. BROUILLET F.	Pharmacie Galénique
Mme CABOU C.	Physiologie
Mme CAZALBOU S. (*)	Pharmacie Galénique
Mme CHAPUY-REGAUD S. (*)	Bactériologie - Virologie
Mme COLACIOS C. (*)	Immunologie
Mme ECHINARD-DOUIN V. (*)	Physiologie
Mme EL GARAH F.	Chimie Pharmaceutique
Mme EL HAGE S.	Chimie Pharmaceutique
Mme FALLONE F.	Toxicologie
Mme FERNANDEZ-VIDAL A.	Toxicologie
Mme GADEA A.	Pharmacognosie
Mme HALOVA-LAJOIE B.	Chimie Pharmaceutique
Mme JOUANJUS E.	Pharmacologie
Mme LAJOIE-MAZENC I.	Biochimie
Mme LEFEVRE L.	Physiologie
Mme LE LAMER A-C. (*)	Pharmacognosie
M. LE NAOUR A.	Toxicologie
M. LEMARIE A.	Biochimie
M. MARTI G.	Pharmacognosie
Mme MONFERRAN S	Biochimie
M. PILLOUX L.	Microbiologie
M. SAINTE-MARIE Y.	Physiologie
M. STIGLIANI J-L.	Chimie Pharmaceutique
M. SUDOR J. (*)	Chimie Analytique
Mme TERRISSE A-D.	Hématologie
Mme TOURRETTE-DIALLO A. (*)	Pharmacie Galénique
Mme VANSTEELANDT M.	Pharmacognosie

(*) Titulaire de l'habilitation à diriger des recherches (HDR)

Enseignants non titulaires

Assistants Hospitalo-Universitaires

M. AL SAATI A	Biochimie
Mme BAKLOUTI S.	Pharmacologie
Mme CLARAZ P.	Pharmacie Clinique
Mme CHAGNEAU C.	Microbiologie
Mme DINTILHAC A.	Droit Pharmaceutique
M. LE LOUEDEC F.	Pharmacologie
Mme RIGOLLOT L.	Biologie Cellulaire, Immunologie
Mme STRUMIA M.	Pharmacie Clinique

Attaché Temporaire d'Enseignement Et de Recherche (ATER)

Mme HAMZA Eya	Biochimie
Mme MALLI Sophia	Pharmacie Galénique
M. TABTI Redouane	Chimie Thérapeutique

Remerciements

Au **Professeur Philippe Cestac**,

Pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de présider ce jury. Je vous exprime mon entière reconnaissance.

Au **Docteur Isabelle Quelven**,

Pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de diriger cette thèse. Pour ta bienveillance et ton aide lors de cette Thèse. J'ai hâte de commencer avec toi cette nouvelle aventure que représente la Thèse d'Université. Je t'exprime mon entière reconnaissance.

Au **Professeur Pierre Payoux**,

Pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de siéger dans ce jury. Je vous remercie vivement d'apporter votre expertise dans le jugement de ce travail et de m'avoir soutenue dans mon projet recherche.

Au **Docteur Céline Colacios**

Pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de siéger dans ce jury. Je te remercie de m'avoir déjà tant aidée. Je suis impatiente de commencer ma Thèse d'Université avec toi.

A tous les membres de la radiopharmacie.

A **Anne So**, pour ta disponibilité et ta bienveillance.

A **Mathieu**, pour tout ce que tu m'as appris (et je ne parle pas que du baby), et ta bonne humeur.

A **Marie**, pour ton écoute et ta gentillesse.

Sans oublier à **Mathieu Tafani**, merci de m'avoir accueillie au cœur de la radiopharmacie de Toulouse.

A tous les préparateurs, pour votre soutien, pour votre bonne humeur et tous ces fous rires. **Béber, Chloé, Edouard, Emi, Fixou, Jérémy, Juju, Laeti, Nico, Nazhia, Rox**, vous êtes les meilleurs.

Aux radiopharmaciens de l'Oncopôle, à **Cholé Lamesa** et plus particulièrement à **Séverine Brillouet** pour m'avoir fourni l'atézolizumab nécessaire à mes manip.

Au service de médecine nucléaire du CHU.

Aux médecins, **Pierre Pascal, Delphine Bastié, Laurent Guillon, Anne Hitzel, Anne Julian et Éric Ouhayoun**. Sans oublier tous les manip radio, aux aides-soignants, aux secrétaires. A **Valérie** et **Manu** pour votre gentillesse.

Aux médecins albigeois, à **Philippe** et plus particulièrement à **Fabrice**, pour les cours particuliers de médecine nucléaire et pour ton aide pour l'interprétation de mes images.

A la radiopharmacie de Bordeaux, **Fred** et **Julie**, pour m'avoir fait découvrir le monde de la radiopharmacie durant mon externat. A mon interne préférée, **Céline**, parce que c'est aussi grâce à toi que j'ai voulu être radiopharmacien.

Aux membres de l'INSERM ToNIC et plus particulièrement à **Maryline, Lorenne, Manon et Hélène** pour votre aide qui m'a permis de mener à bien cette thèse.

A **mes parents et à ma sœur** qui m'ont toujours soutenue tout au long de ma vie. Merci d'avoir toujours eu confiance en moi et d'avoir fait de moi celle que je suis aujourd'hui. A mes **grands-parents**, pour leur soutien tout au long de mes études.

A tous mes amis bordelais, **Dada, Clairou et Farah**, pour avoir été les meilleures copines du monde. A **Danny** parce qu'en fait, c'est toi la meilleure. **A Pierre** pour m'avoir acceptée comme coloc. **A Alex** pour toutes nos discussions à n'en plus finir. **A Benji et Crysta** pour toutes ces soirées chez vous. **A Mickado** pour tous nos fous rires. **A Alex, Quentin, Alice, Gus, et Hugo** pour toutes ces soirées au Cone ou rue de Saintonge ensemble. A **Romain, Seb, Paul, Caro, Flo, Antoine, Henri, Sacha**, pour toutes ces années et ces verres au P'tit Q.

A mon amie d'enfance **Inès**, pour toutes nos années d'amitié et ton soutien indéfectible. A **Annabelle**, pour tous nos délires à la pharmacie et pour nos supers moments à Paris.

A tous mes amis toulousains, **Soso (de la night)** pour ton soutien sans faille et toutes nos balades. A **Rejrej**, pour avoir été une de mes premières copines et pour tous nos moments passés ensemble. A **Soso (bis)** parce qu'en plus d'être une super amie tu seras la meilleure des médecins. A **Anne-Cécile**, pour toutes nos conversations sur la route du Mordor. A toute ma promo d'internat qui m'a fait passer de supers années. **A Sandrine et Julie**, pour le gang des minimes.

A mes co-internes de radiophar, **Cécé** pour toutes nos discussions et pour avoir aidé le roseau que je suis, **Juju** (et **Mymy**) pour notre année passée ensemble, sans oublier notre super coloc de Paris, **Raymond** pour avoir été le meilleur partenaire de baby (on a battu le chef), sans oublier **Mathilde, Nils et Rox** pour tous nos délires et votre bonne humeur.

Aux internes de bios, **Yaya, PP6, Maëlys, Joy, Apo, Lucie, Elie**, pour tous ces bons moments et **Benji** pour nos petits moments de soutien moral. Et à tous les autres bios pour nos parties de baby enflammées.

A **Thibaut**, pour avoir été toujours là pour moi, pour ton amour, pour être mon bou.

Et évidemment à **Nono** pour être mon Prix Nobel.

Sommaire

Remerciements.....	6
Sommaire	9
Table des figures.....	11
Table des tableaux.....	15
Abréviations.....	16
Introduction générale	19
Chapitre 1 : Immunoglobulines & anticorps monoclonaux	20
I. Caractéristiques des immunoglobulines	20
1. Structure des immunoglobulines.....	20
2. Relation structure/fonction des immunoglobulines.....	22
3. Classification et fonctions des immunoglobulines humaines ⁸	24
II. Production des anticorps monoclonaux.....	27
1. Historique et techniques.....	27
2. Les variants des anticorps monoclonaux.....	30
3. Pharmacocinétique des anticorps monoclonaux et variants d'anticorps	36
III. Applications des anticorps monoclonaux	38
1. Cibles et modes d'action des anticorps	39
2. Effets indésirables et limites des anticorps monoclonaux.....	40
Chapitre 2 : L'immuno-tomographie par émission de positons.....	43
I. La tomographie par émission de positons	43
1. Introduction.....	43
2. Le médicament radiopharmaceutique.....	44
3. Les radionucléides	45
4. L'imagerie TEP	46
II. Intérêts et perspectives de l'immunoTEP	47
1. Les limites de la TEP métabolique	48
2. État des lieux et intérêt de l'immunoTEP	49
3. L'immunoTEP anti-PD-L1 en oncologie.....	51
4. L'immunoTEP anti-IL6R et les maladies inflammatoires.....	56
Chapitre 3 : Radiomarquage d'anticorps dans l'ImmunoTEP.....	59
I. Méthode directe ou méthode indirecte de radiomarquage	60
1. Méthode directe.....	60
2. Méthode indirecte.....	60
II. Méthodes de fonctionnalisation de l'anticorps.....	62
1. Fonctionnalisation non site spécifique	62
2. Fonctionnalisation spécifique au site ⁹⁵	64
III. Chimie des métaux	68

1. Notion de complexation	68
2. Stabilité des complexes.....	68
3. Influence des paramètres des radiométaux sur la stabilité du complexe <i>in vivo</i>	71
IV. Le Zirconium 89 et le Cuivre 64 en immuno-TEP.....	73
1. Le Zirconium 89.....	74
2. Le Cuivre 64.....	80
Chapitre 4 : Mise au point du radiomarquage au Zirconium 89 et au Cuivre 64 d'anticorps monoclonaux : le tocilizumab et l'atézolizumab.....	87
I. Introduction	87
II. Matériel et méthodes	88
1. Matériel	88
2. Méthodes :.....	90
III. Résultats.....	100
1. Fonctionnalisation et radiomarquage des anticorps.....	100
2. Étude <i>in vitro</i>	115
3. Étude <i>in vivo</i>	121
IV. Discussion	126
Conclusion-Perspectives.....	131
Serment de Galien.....	132
Bibliographie	133

Table des figures

FIGURE 1 : STRUCTURE EN 3 DIMENSIONS D'UNE IG ¹	20
FIGURE 2 : STRUCTURE « ECLATEE » D'UN ANTICORPS* ¹	21
FIGURE 3 : PROTEOLYSE ENZYMATIQUE DES IMMUNOGLOBULINES ²	22
FIGURE 4 : STRUCTURE TRIDIMENSIONNELLE DE LA REGION FAB D'UNE IMMUNOGLOBULINE ³	23
FIGURE 5 : STRUCTURE TRIDIMENSIONNELLE DE LA REGION Fc D'UNE IMMUNOGLOBULINE IGG1 ³	24
FIGURE 6 : STRUCTURE DES DIFFERENTES IG HUMAINES ⁹	25
FIGURE 7 : STRUCTURE DES AC EN FONCTION DE LEUR CARACTERISTIQUES MURINES ET HUMAINES ¹¹	27
FIGURE 8 : DIFFERENTS MODES DE PRODUCTION DES AC EN FONCTION DE LEUR DEGRE D'HUMANISATION ¹¹	28
FIGURE 9 : RELATION STRUCTURE FONCTION D'UN AC* ⁸	30
FIGURE 10 : DIFFERENTS TYPES D'AC ET FRAGMENTS D'AC ²²	32
FIGURE 11 : LES DIFFERENTS TYPES D'AC, DE L'AC ENTIER AU FRAGMENT Fv, ET LEUR IMPACT SUR LEUR PHARMACOCINETIQUE ²³	33
FIGURE 12 : LES CATEGORIES ET SOUS-CATEGORIES DE PRODUITS THERAPEUTIQUES ³²	35
FIGURE 13 : MECANISMES D'ELIMINATION DE L'AC ³⁸	38
FIGURE 14 : MECANISMES D'ACTION DES AC THERAPEUTIQUES DANS LES ETUDES CLINIQUES DE STADE AVANCE*. DIAGRAMMES D'EULER PROPORTIONNELS A L'AIRES REPRESENTANT LES PRINCIPAUX MECANISMES D'ACTION DES AC DANS LES ETUDES CLINIQUES DE STADE AVANCE. (A) AC POUR DES INDICATIONS NON CANCEREUSES ; (B) AC POUR LES INDICATIONS DE CANCER. *DONNEES AU 1ER OCTOBRE 2022	39
FIGURE 15 : PRINCIPE DE L'IMAGERIE TEP* ⁵¹	47
FIGURE 16 : STRUCTURE D'UN AC ET LES APPLICATIONS MEDICALES DU RADIOMARQUAGE DE L'AC ⁵⁶	49
FIGURE 17 : REPRESENTATION DES MECANISMES D'ACTION DES INHIBITEURS DE CHECKPOINT ⁶⁹	51
FIGURE 18 : FIXATION TUMORALE DE L'ATEZOLIZUMAB RADIOMARQUE AU ⁸⁹ Zr CHEZ 5 PATIENTS ⁵¹	55
FIGURE 19 : ROLES DE L'INTERLEUKINE 6 DANS LA POLYARTHRITE RHUMATOÏDE ⁸¹	56

FIGURE 20 : FIXATION DE L'AC ANTI-IL6R RADIOMARQUE AU ^{99m}Tc (A) ET DE L'AC IRRELEVANT (B) SUR LES TISSUS SYNOVIAUX HUMAINS IMPLANTES ⁸⁷ . FLECHES JAUNES : TISSU IMPLANTE.....	58
FIGURE 21 : CLASSIFICATION PERIODIQUE DES ELEMENTS	59
FIGURE 22 : MARQUAGE DIRECT ET INDIRECT DE PROTEINES PAR DES RADIOMETAUX ⁸⁹	60
FIGURE 23: STRUCTURE D'UN CHELATANT BIFONCTIONNEL	61
FIGURE 24 : REPRESENTATION DES FONCTIONS ESTER NHS ET ISOTHIOCYANATE.....	62
FIGURE 25 : : FONCTIONNALISATION PAR LES FONCTIONS ESTER NHS (A) ET ISOTHIOCYANATE (B) ⁸⁹	63
FIGURE 26 : REPRESENTATION DES FONCTIONS ESTER IODOACTEYLE ET MALEIMIDE.....	63
FIGURE 27 : BIOCONJUGAISON PAR INGENIERIE CYS ⁸⁴	64
FIGURE 28 : BIOCONJUGAISON PAR METHODE ENZYMATIQUE ET CHIMIO-ENZYMATIQUE ⁸⁴ ..	65
FIGURE 29 : BIOCONJUGAISON PAR LA SORTASE A ⁸⁴	65
FIGURE 30 : CYCLOADDITION AZIDE-ALKYNE (SPAAC) ⁸⁴	67
FIGURE 31 : CYCLOADDITION DIELS-ALDER (IEDDA) ⁸⁴	67
FIGURE 32 : SCHEMA DE DESINTEGRATION DU ^{89}Zr	74
FIGURE 33 : REPRESENTATION DE CHELATANT NON HYDROXAMATE : EDTA (A) ET DTPA (B)	77
FIGURE 34 : FONCTIONNALISATION AVEC NCS-BZ-DF ET RADIOMARQUAGE AU ^{89}Zr D'UN AC MONOCLONAL ¹¹¹	78
FIGURE 35 : STRUCTURE DU LIGAND DESFERRIOXAMINE ET SES DERIVES ⁹⁶	79
FIGURE 36 : SCHEMA DE DESINTEGRATION DU ^{64}Cu	80
FIGURE 37 : STRUCTURE DES LIGANDS EDTA (A) ET DTPA (B)	82
FIGURE 38 : STRUCTURE DU DOTA (A) ET TETA (B) ¹²⁰	83
FIGURE 39 : STRUCTURE DU NOTA.....	84
FIGURE 40 : STRUCTURE SARCOPHAGINE.....	84
FIGURE 41 : STRUCTURE DES LIGANDS CB-DO2A (A) ET CB-TE2A (B)	85
FIGURE 42 : STRUCTURE DU CB-TE1A1P	85
FIGURE 43 : COURBE DE CALIBRATION DU PAVILIZUMAB COMMERCIAL : ABSORBANCE EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN AC (MG/ML), UV A 230NM.....	90
FIGURE 44 : GAMME ETALON REALISEE PAR LE KIT BCA POUR LA MISE AU POINT DU DOSAGE DES AC A 562NM	91

FIGURE 45 : REPARTITION DES MODELES MURINS (CIA), CONTROLES (SHAM), ET TEMOINS SAINS EN FONCTION DES AC RADIOMARQUES (PAVILIZUMAB, AC ANTI-IL-6MR) INJECTES	99
FIGURE 46 : ÉVOLUTION DE LA PRC DANS LE MILIEU AU COURS DU TEMPS EN FONCTION DES DIFFERENTS RATIOS DE CHELATION. * : DIFFERENCE SIGNIFICATIVE ENTRE 30MIN ET 2H POUR LE RATIO MOLAIRE 1 :3 DE DFO.....	102
FIGURE 47 : : COMPARAISON DES RENDEMENTS OBTENUS EN FONCTION DE LA QUANTITE D'AC CHELATE ET DU RATIO CHELATANT/AC. AC : ANTICORPS ; DFO : DESFERRIOXAMINE, * : DIFFERENCE SIGNIFICATIVE ENTRE LA CONDITION 5MG DFO 1 :3 ET 2MG DFO 1 :3 (P<0,05).....	103
FIGURE 48 : HPLC A CHAQUE ETAPE DU RADIOMARQUAGE DU PAVILIZUMAB 5MG DFO X3	105
FIGURE 49 : INFLUENCE DE L'ACTIVITE SPECIFIQUE (16MBQ/MG, 32MBQ/MG) SUR LE RENDEMENT DE MARQUAGE D'AC AU ⁸⁹ ZR	107
FIGURE 50 : PRC OBTENUES EN FONCTION DU TEMPS ET DE LA TEMPERATURE D'INCUBATION DES CHELATANTS (RATIO MOLAIRE 1:20) A 30MIN POST-MARQUAGE AU ⁶⁴ Cu. PRC : PURETE RADIOCHIMIQUE ; ON RT : OVERNIGHT ROOM TEMPERATURE.....	110
FIGURE 51: ÉVOLUTION DE LA PRC DES AC RADIOMARQUES AU ⁶⁴ Cu DANS LE MILIEU AU COURS DU TEMPS EN FONCTION DES DIFFERENTS CHELATANTS (DOTA NHS, DOTA SCN, NOTA SCN. * : DIFFERENCE SIGNIFICATIVE (P<0,001) ENTRE 30MIN ET 2H D'INCUBATION POUR LE RATIO MOLAIRE 1 :10 DU NOTA SCN	111
FIGURE 52 : PRC OBTENUES EN FONCTION DU RATIO MOLAIRE DES CHELATANTS APRES 2H D'INCUBATION D'AC CHELATES (DOTA-NHS, DOTA-SCN, NOTA-SCN) ET RADIOMARQUES AU ⁶⁴ Cu. * : DIFFERENCE SIGNIFICATIVE ENTRE LE DOTA NHS (RATIO MOLAIRE 1 :20) ET LES DEUX AUTRES CHELATANTS (1 :20).....	112
FIGURE 53 : INFLUENCE DE L'ACTIVITE SPECIFIQUE (200MBQ/MG ET 100MBQ/MG) SUR LE RENDEMENT DE MARQUAGE D'AC AU ⁶⁴ Cu EN FONCTION DU CHELATANT DE RATIO MOLAIRE 1:20	113
FIGURE 55 : PROFIL FACS DE L'EXPRESSION DE PD-L1 (A) ET IL-6R (B) DES MDA-MB231. PD-L1 COUPLE AU PE-A (ROUGE), IL-6R COUPLE AU PERCP-Cv5-5-A (BLEU), CONTROLE (GRIS)	117
FIGURE 56 : DETERMINATION DE L'IMMUNOAFFINITE DU TOCILIZUMAB RADIOMARQUE SUR CELLULES MDA-MB231	118

FIGURE 57 : DETERMINATION DE L'IMMUNOAFFINITE DE L'ATEZOLIZUMAB RADIOMARQUE SUR AG COATES PD-L1. LT : LIAISON TOTALE, LNS : LIAISON NON SPECIFIQUE, LS : LIAISON SPECIFIQUE, B : CONCENTRATION AC LIE, AC : CONCENTRATION TOTALE EN AC AJOUTES	119
FIGURE 58 : DETERMINATION DE L'IMMUNOREACTIVITE DU TOCILIZUMAB RADIOMARQUE SUR CELLULES MDA-MB231	120
FIGURE 59 : QUOTATION DU SCORE ARTHRITIQUE PAR PATTE DES LESIONS ARTHRITIQUES DISTALES (IMAVITA). CIA : COLLAGEN INDUCED ARTHRITIS.....	121
FIGURE 60 : ÉTUDE DE LA FIXATION ENTRE LES SOURIS MALADES (CIA MICE) ET LA SOURIS CONTROLE (SHAM). SA : SCORE ARTHRITIQUE	122
FIGURE 61 : ÉTUDE DE LA FIXATION DU ⁸⁹ ZR-AC ANTI-IL6R CHEZ LA SOURIS SHAM (A) ET CIA (B) A J1 POST INJECTION. CIA : COLLAGEN INDUCED ARTHRITIS ; SCORE ARTHRITIQUE DE LA SOURIS CIA : 11/16	123
FIGURE 62 : IMAGERIE TEP A J1 ET J5 DE L'AC ANTI RECEPTEUR MURIN A L'IL6 RADIOMARQUE AU ⁸⁹ ZR CHEZ UNE SOURIS SHAM (SOURIS N°6) ET UNE SOURIS MALADE (SOURIS N°8). INJECTION DE 0,3 A 0,5MBQ CHEZ UNE SOURIS SHAM ET CIA DE 89ZR-ANTIIL6MR. IMAGERIE A J1 ET J5 AVEC UNE ACQUISITION DE 30 A 40MIN.	124
FIGURE 63 : ÉTUDE DE LA FIXATION DU ⁸⁹ ZR-AC TEMOIN CHEZ LA SOURIS CIA (A) ET SHAM (B) A J1 POST INJECTION. CIA : COLLAGEN INDUCED ARTHRITIS ; SCORE ARTHRITIQUE DE LA SOURIS CIA : 13/16 ; FLECHE BLANCHE : FIXATION AU NIVEAU DE DISTALE DE LA PATTE	125

Table des tableaux

TABLEAU 1 : LES DIFFERENTES FONCTIONS EFFECTRICES EN FONCTION DES CLASSES ET SOUS-CLASSES D'IG.....	27
TABLEAU 2 : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE DES ETUDES PRE-CLINIQUES ET CLINIQUES DES AC ANTI-PD-L1 RADIOMARQUES	53
TABLEAU 3 : COMPARAISON DU ZIRCONIUM 89 ET DU CUIVRE 64	73
TABLEAU 4 : RECAPITULATIF DES CONDITIONS TESTEES LORS DE LA MISE AU POINT DU RADIOMARQUAGE AU ⁸⁹ Zr.....	100
TABLEAU 5 : PRC OBTENUES SUR 2H EN FONCTION DES CONDITIONS DE CHELATION ET DE RADIOMARQUAGE TESTEES.....	101
TABLEAU 6 : RECAPITULATIF DES CONDITIONS ET PRC DU RADIOMARQUAGE	104
TABLEAU 7 : PERTE EN ACTIVITE D'AC RADIOMARQUES APRES PURIFICATION	106
TABLEAU 8 : TABLEAU RECAPITULATIF DES PRC OBTENUES EN FONCTION DES DIFFERENTES CONDITIONS DE CHELATION ET DE MARQUAGE CHOISIES ..	ERREUR ! SIGNET NON DEFINI.
TABLEAU 9 : STABILITE DE RADIOMARQUAGE EN FONCTION DES DIFFERENTES CONDITIONS DE CHELATION : SUIVI DE LA VARIATION DE LA PRC DES 89Zr-DFO-AC A J1, J3 ET J5 PAR RAPPORT A J0	115
TABLEAU 10 : STABILITE DE RADIOMARQUAGE EN FONCTION DES DIFFERENTES CONDITIONS DE CHELATION : SUIVI DE LA VARIATION DE LA PRC DES 64Cu-NOTA-AC A J1 ET J2 PAR RAPPORT A J0.	116
TABLEAU 11 : MOYENNES ET ECART-TYPES DE LA FIXATION DU [18F]FDG EN FONCTION DU SCORE ARTHRITIQUE DES SOURIS CIA ET DES SOURIS CONTROLES.	122

Abréviations

Ac : Anticorps

Ac anti-IL-6mR : Anticorps anti-récepteur murin à l'IL6

AcM : Anticorps monoclonal

ADCC : cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps

Ag : Antigène

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché

BPF : Bonne pratique de fabrication

C : Constant

CCM : Chromatographie sur Couche Mince

CCO : Cytochrome oxydase

CDC : cytotoxicité dépendante du complément

CDR : Complementary Determining Region

Ctr1: High affinity copper uptake protein 1

Cu : Cuivre

⁶⁴Cu : Cuivre 64

C1q : Complexe C1

CIA : Collagen Induced Arthritis

CPA : Cellule présentatrice d'antigène

CPNPC : Cancer du poumon non à petites cellules

CSTN : Cancer du sein triple négatif

CRS : Syndrome de relargage cytokinique

CTLA-4 : antigène 4 du lymphocyte T cytotoxique

CXCR4: C-X-C chemokine receptor 4

¹¹C : Carbone 11

DFO : Desferrioxamine B

DFO : Diméthylformamide

DMLA : Dégénérescence maculaire liée à l'âge

DOTA : acide 2,2',2'',2'''-(1,4,7,10-tétraazacyclododécane-1,4,7,10 tétrayl)
tétraacétique

DTPA : acide diéthylènetriaminepentaacétique

EDTA : acide éthylènediaminetétraacétique

EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor

Fab: Fragment « antigen binding »
Fc : Fragment cristallisable
FDG : Fluorodésoxyglucose
FR : Framework région
¹⁸F: Fluor 18
H: Heavy (chaîne lourde)
HAHA: Human anti-human antibody
HAMA: Human anti-mouse antibody
HER2: Human Epidermal Growth Factor Receptor-2
HPLC: High Performance Liquid Chromatography
IEDDA: cycloaddition Diels-Alder
Ig : Immunoglobuline
IL : Interleukine
IRF : Fraction immunoréactive
ITLC-SG: Instant Thin Layer Chromatography Silica Gel
IV : Intraveineux
¹²³I : Iode 123
k_D: Constante de dissociation
L : Light (chaîne légère)
LT/LS/LNS : Liaison Totale/Liaison Spécifique/Liaison Non Spécifique
MET: Methionine
Mf: Metal-free
MRP : Médicament radiopharmaceutique
NCS : Isothiocyanate
NHS: N-hydroxysuccinimide
NOTA: 1,4,7-triazacyclononane-1,4,7-triacetic acid
ON RT: Overnight Room Temperature
PBS: Phosphate Buffered Saline
PDX: Patient derived xenograft
PEG: polyethylene glycol
PET-CT: Positron Emission Tomography-Computed Tomography
PD-1/PDL1: Programmed cell Death protein 1/ Programmed cell Death protein 1
Ligand
PR : Polyarthrite Rhumatoïde

PRC : Pureté Radiochimique
R : Récepteur
RIA : RadiolImmunoAssay
RIT : Radioimmunothérapie
RIV : Radiothérapie Interne Vectorisée
SOD : Superoxyde dismutase
SPAAC: Strain-promoted azide-alkyne cycloaddition
ScFv : single-chain-Fragment-variable
TDM : Tomodensitométrie
TEMP : Tomographie par Émission MonoPhotonique
TEP : Tomographie par Émission de Positons
Théranostique : Contraction de thérapie et diagnostique
TNF : Facteur de nécrose tumorale
Tr/min : Tour par minute
Tr : Temps de rétention
^{99m}Tc : Technétium 99 métastable
UMR : Unité Mixte de Recherche
UPLC : Ultra Performance Liquid Chromatography
UV: Ultraviolet
V: Variable
VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor
VOI: Volume of Interest
Zr : Zirconium
⁸⁹Zr : Zirconium-89

Introduction générale

Au cours des 30 dernières années, des avancées majeures ont été réalisées dans la prise en charge des cancers et des pathologies auto-immunes. Ces améliorations ont été possibles en particulier grâce à la progression de la compréhension des mécanismes immunitaires et au développement de stratégies thérapeutiques basées sur les anticorps monoclonaux. Face à des réponses cliniques hétérogènes et aux multiples options thérapeutiques disponibles, un enjeu majeur est apparu : personnaliser la prise en charge des patients. Les approches immunologiques représentent une solution attractive pour répondre à cette problématique. En effet, la combinaison de la tomographie par émission de positons (TEP) avec des anticorps monoclonaux permet la réalisation d'une imagerie spécifique appelée immunoTEP.

Afin de développer des radiotraceurs pour l'immunoTEP, le choix des radionucléides est une question essentielle. Combinant des périodes appropriées pour la biodistribution des anticorps et des propriétés d'émission favorables pour l'imagerie, le cuivre-64 (^{64}Cu) et le zirconium-89 (^{89}Zr) deviennent peu à peu *le gold standard* de l'immunoTEP avec un avantage pour le premier en termes de dosimétrie.

Dans cette thèse, nous exposerons une revue de la littérature en commençant par les immunoglobulines et des anticorps monoclonaux, puis nous aborderons l'immunoTEP et les techniques de radiochimie du ^{89}Zr et du ^{64}Cu que nécessite le développement de radiotraceur pour l'immunoTEP.

Dans un second temps, nous présenterons une partie expérimentale, correspondant à la mise au point du radiomarquage d'anticorps monoclonaux, le tocilizumab et l'atézolizumab, au ^{89}Zr et au ^{64}Cu , ainsi que l'étude *in vitro* de stabilité et d'affinité de ces anticorps radiomarqués. Pour finir, nous aborderons les premiers résultats de l'étude de l'intérêt du tocilizumab radiomarqué au ^{89}Zr dans un modèle murin de polyarthrite rhumatoïde.

Chapitre 1 : Immunoglobulines & anticorps monoclonaux

I. Caractéristiques des immunoglobulines

1. Structure des immunoglobulines

Les premières références aux immunoglobulines (Ig) datent de 1890, lorsque Emil Von Behring et Shibasaburo Kitasato ont découvert la présence dans le sang d'une substance capable de neutraliser la toxine diphtérique. En 1940, le premier modèle de structure d'une Ig a été mis en évidence par Pauling, il est alors composé de deux sites de reconnaissance antigénique reliés par un pont. Vingt ans plus tard, Nisonoff et Porter ont réussi à diviser une Ig en fragments bien distincts, les fragments Fab et Fc, que nous développerons par la suite. En 1964, le modèle d'une Ig se complexifia grâce à Fleischman, une Ig est alors composée de deux chaînes lourdes identiques, chacune complétée par deux chaînes légères identiques (Figure 1).

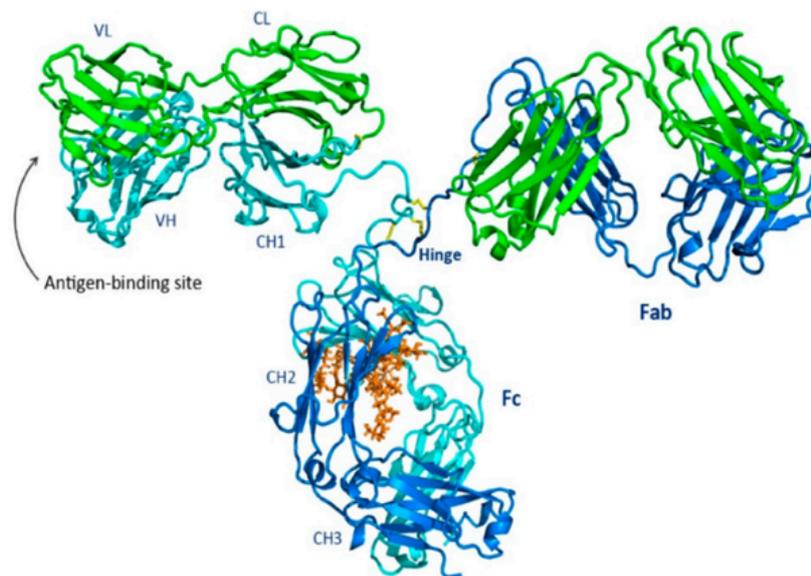


Figure 1: Structure en 3 dimensions d'une Ig¹

Fab : Fragment « antigen binding » ; Fc : Fragment cristallisable ; L / H : Light (chaîne légère) / Heavy (chaîne lourde) ; C / V : Constante / Variable ; Antigen binding site : Site liaison antigénique

En 1972, Gerald Edelman et Rodney Porter ont obtenu un Prix Nobel pour leurs travaux sur la structure chimique des anticorps : ils sont alors composés de deux

chaînes lourdes identiques (H pour *heavy*) et deux chaînes légères identiques (L, *light*), kappa ou lambda, de 50 et 25 kDa.

Des ponts disulfures inter-chaînes appariant les chaînes légères aux chaînes lourdes, formant ainsi un complexe dimérique, et permettent d'assurer une flexibilité à la molécule (Figure 2). A noter, que le nombre de ponts disulfures inter-chaînes varie en fonction des molécules d'Ig.

Pour finir, il existe également des ponts disulfures intra-chaîne au sein de chaque chaîne polypeptidique.

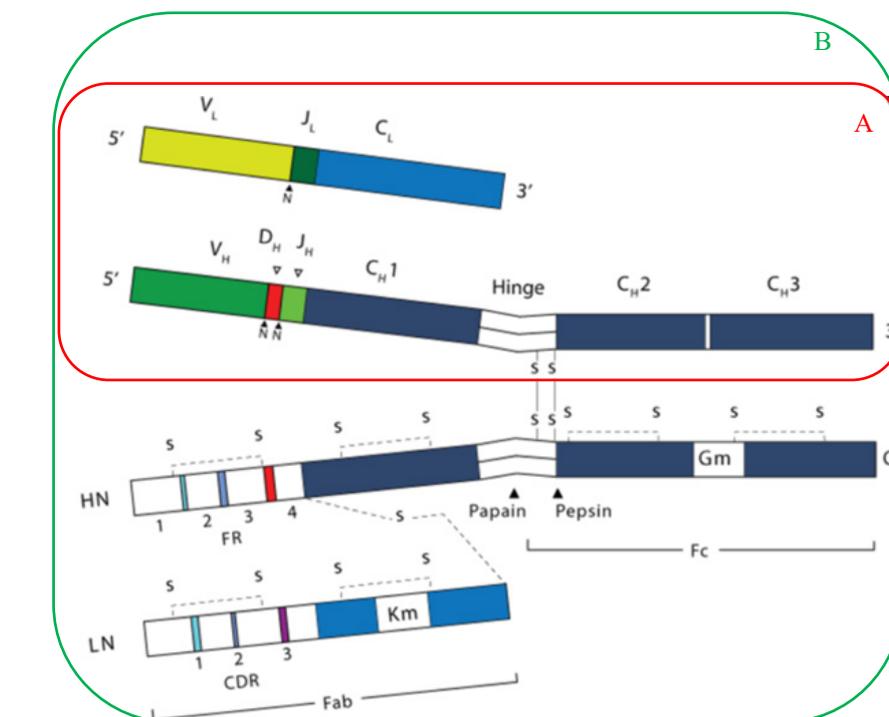


Figure 2 : Structure « éclatée » d'un anticorps*¹

Fab : Fragment « antigen binding » ; Fc : Fragment cristallisable ; L / H : Light (chaîne légère) / Heavy (chaîne lourde) ; C / V : Constante / Variable ; s-s : pont disulfure ; A : Complexe dimérique chaîne légère-chaîne lourde ; B : Immunoglobuline complète / Association de deux dimères
* : figure originale modifiée

Les quatre chaînes polypeptidiques sont formées d'une succession de domaines, d'environ 110 acides aminés, qui forment au niveau tridimensionnel des feuillets β (Figure 1). Ces régions globulaires sont réparties de la façon suivante :

- au niveau des chaînes légères : deux domaines, un variable (VL) et un constant (CL).
- au niveau des chaînes lourdes : quatre domaines, un variable (VH), et trois constants (CH1 à CH3, et éventuellement CH4).

Les domaines variables de la chaîne libre et de la chaîne lourde, qui se trouvent à leurs extrémités N-terminales, forment la région variable de l'Ig et permettent la liaison à l'antigène (Ag). Les domaines constants des chaînes lourdes et légères forment la région constante de l'Ig.¹

2. Relation structure/fonction des immunoglobulines

En 1958, Porter et Edelman, grâce à la protéolyse enzymatique par la papaine, ont séparé l'Ig en deux parties fonctionnelles : le fragment Fab (pour *fragment antigen binding*) et le fragment constant Fc (fragment cristallisable). De plus, la protéolyse par la pepsine a permis de diviser l'Ig différemment : une partie F(ab') et une partie Fc, le fragment F(ab')₂ étant un fragment dimérique. (Figure 3)

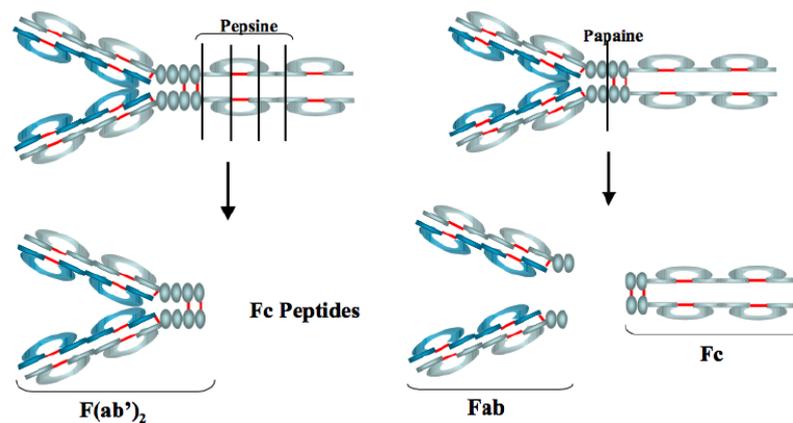


Figure 3 : Protéolyse enzymatique des immunoglobulines²

a. La région Fab et la liaison de l'anticorps à l'antigène

La partie N-terminale des bras Fab contient les séquences variables, qui diffèrent entre les Ig pour leur conférer des spécificités distinctes. Ces parties variables (Fv) sont composées d'une paire de domaines variables (VH et VL) liée aux chaînes lourdes et légères de l'Ig.

Néanmoins, cette diversité n'est pas homogène tout au long de la séquence protéique sur une même Ig. En effet, chaque domaine variable possède trois régions hypervariables : HV1, HV2 et HV3. Ces dernières sont encadrées dans des Framework région, FR1, FR2, FR3 et FR4, qui sont définies par une variabilité moindre et qui permettent d'assurer la structure du domaine variable (Figure 2).

Comme leur nom l'indique, les régions hypervariables sont très peu conservées entre les Ig. Elles sont propres à chaque Ig ainsi, leurs séquences et leurs organisations dimensionnelles forment le paratope qui est responsable de la spécificité et de la complémentarité d'une Ig pour un épitope d'un Ag, elles sont alors appelées CDR (régions déterminantes de complémentarités ou *complementary determining region en anglais*) : CDR-L1, CDR-L2, et CDR-L3 pour VL et CDR-H1, CDR-H2, et CDR-H3 pour VH.³ (Figure 4)

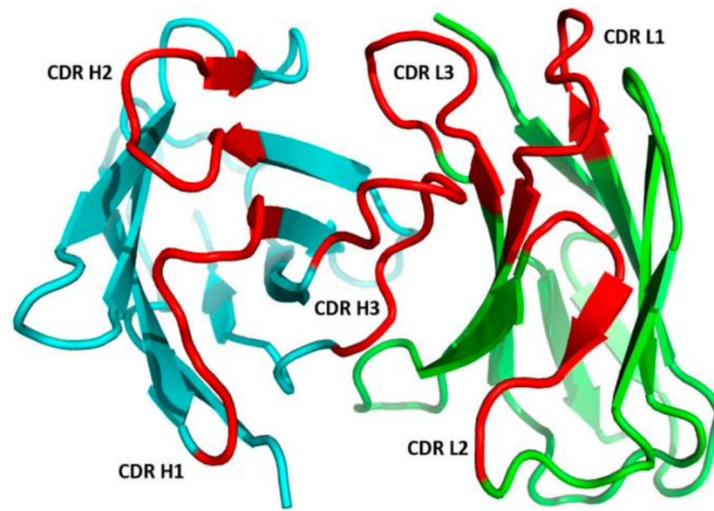


Figure 4 : Structure tridimensionnelle de la région Fab d'une immunoglobuline³

Néanmoins, des études montrent que la spécificité de la liaison à l'Ag ne se limite pas aux régions HV mais impliquerait également les domaines CH.⁴ La liaison Ig-Ag est une liaison non covalente, faisant intervenir des interactions électrostatiques, des liaisons hydrogènes, des forces de Van der Waals et des forces hydrophobes, elle est donc réversible.

b. La région Fc et ses fonctions³

Les caractéristiques structurales de la région Fc de l'Ig ont été définies lors de la détermination de la structure initiale de l'Ig G1 humaine⁵.

Elle correspond aux fragments CH2 et CH3 des deux chaînes lourdes (Figure 5) et est responsable des fonctions effectrices de l'Ig par interaction avec le complexe C1 (C1q) pour médier la cytotoxicité cellulaire dépendante des Ig (ADCC), la cytotoxicité dépendante du complément (CDC) ou la phagocytose cellulaire dépendante⁶.

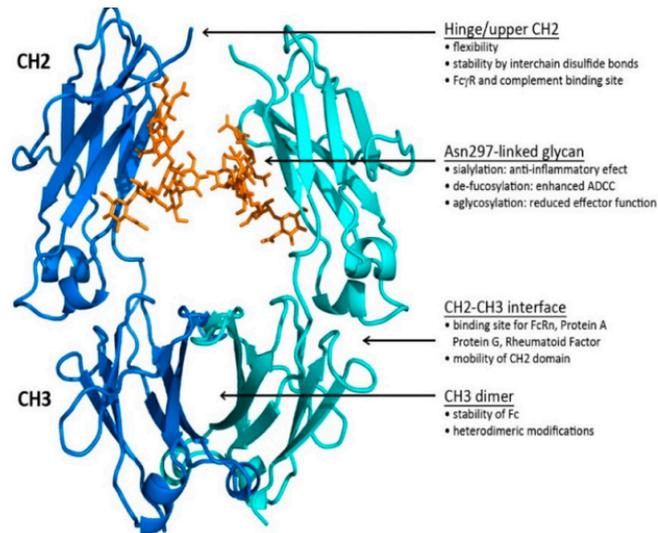


Figure 5 : Structure tridimensionnelle de la région Fc d'une immunoglobuline IgG1³

Chaines bleues et turquoise : chaînes lourdes CH2 et CH3 ; Orange : Carbohydate

L'interface CH2 CH3 est dominée par des interactions non covalentes entre les deux domaines, complétées par la présence de molécules d'eau ordonnées. Elle offre un site de liaison pour le FcRn, la protéine A, la protéine G ainsi que le facteur rhumatoïde. L'espace entre les CH2 est rempli en partie par des glucides attachés à Asn297 sur lequel viennent se greffer d'autres résidus. Ce profil est primordial pour lier le C1q et les récepteurs Fc. Des expériences ont montré que des modifications sur ces sucres influençaient les fonctions effectrices de l'IgG (effet anti-inflammatoire, fonction effectrice...).⁷

3. Classification et fonctions des immunoglobulines humaines⁸

En 1939, Tiselius et Kabat ont réussi à séparer, par électrophorèse, l'albumine et des différentes fractions de globulines : alpha globuline, bêta globuline, et gammaglobuline. Les Ig font partie de la fraction gamma des protéines sériques.

Les différentes Ig sont produites par les plasmocytes (cellules provenant de la différenciation des lymphocytes B) lors de la réponse adaptative humorale en réponse à un Ag. Elles sont alors appelées anticorps (Ac).

Lorsqu'elles sont liées aux lymphocytes B, elles jouent alors le rôle de structure de reconnaissance du lymphocyte B ou BCR, c'est-à-dire qu'elles constituent des Ig de surface spécifique d'un Ag.

Nous nous concentrerons ici, sur les Ig circulantes, dites solubles, ou Ac.

Au sein des Ig humaines, il existe 5 isotypes déterminés par la séquence d'acides aminés de la région constante de leurs chaînes lourdes : IgA, IgD, IgE, IgG et IgM, possédant respectivement les chaînes lourdes « Alpha », « Delta », « Epsilon », « Gamma », « Mu ».

Il existe respectivement 2 et 4 sous-classes d'IgA et IgG. ⁹

Les IgA, IgD et IgG possèdent trois domaines constants et un domaine variable.

Les IgE et les IgM ont un domaine variable et quatre domaines constants.

Les isotopes IgA et IgM possèdent une chaîne J supplémentaire, qui permet la formation de dimères et de pentamères, respectivement. Les autres isotypes sont des monomères (un monomère étant défini ici comme une paire de chaînes lourdes et légères)³. (Figure 6)

Chaque classe d'Ac est caractérisée par une chaîne lourde, mais ils partagent une chaîne légère commune qui peut appartenir à la classe kappa ou lambda. Environ deux tiers des Ac endogènes contiennent des chaînes légères kappa.

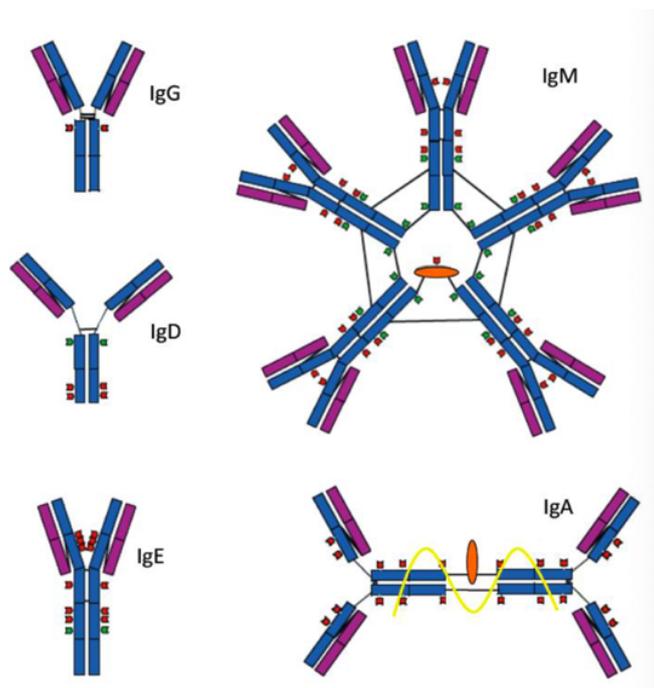


Figure 6 : Structure des différentes Ig humaines ⁹

a. Les IgG :

Les IgG sont les Ig majoritaires dans le sang (75% des Ig). La région Fc d'une IgG peut s'engager avec les récepteurs Fc gamma (FcγR) et le premier sous-composant du complexe C1 (C1q) pour assurer de multiples mécanismes tels que la médiation de

la cytotoxicité cellulaire dépendante des Ac (ADCC), de la cytotoxicité dépendante du complément (CDC), de la phagocytose cellulaire dépendante des Ac (ADCP), de la trogocytose cellulaire dépendante des Ac, la phagocytose cellulaire dépendante des Ac (ADCP).

b. Les IgM :

Les IgM existent normalement sous la forme de pentamères (Ig19S) mais peuvent aussi exister sous la forme de monomères. Dans leur forme pentamérique, toutes les chaînes lourdes et chaînes légères sont identiques. Les IgM ont un domaine surnuméraire sur la chaîne mu (nommé CH4), et sont associées de façon covalente, par un pont disulfure, à une autre protéine appelée chaîne J. La fonction principale de l'IgM est la fixation du complément mais il est également un très bon Ac agglutinant. Ainsi les IgM sont particulièrement efficaces pour lyser les micro-organismes. De plus, cette Ig, sous forme monomère, est capable de s'ancrer à la surface des lymphocytes B. Par le biais de deux protéines, Ig- α et Ig- β (B cell Antigen Receptor BcR), une transduction du signal est possible.

c. Les IgA :

Les IgA sont retrouvées sous formes monomériques dans le sérum mais sous forme dimérique dans les sécrétions (larmes, salive, colostrum, mucus...). Leur forme dimérique comporte une pièce ou composante sécrétoire qui les protège de l'action protéolytique des enzymes et leur permet de former un film empêchant l'adhésion bactérienne. (Figure 6) Les IgA sont également impliquées dans les mécanismes de cytotoxicité.

d. Les IgE :

Du fait de la forte capacité des IgE à se fixer aux récepteurs Fc des basophiles et des mastocytes, la forme libre des IgE est plus rarement retrouvée dans le sérum. Les IgE jouent un rôle prédominant dans les réactions allergiques, en permettant la dégranulation des basophiles entre autres, et dans les maladies parasitaires.

e. Les IgD :

Les IgD sont essentiellement retrouvées à la surface des cellules B, agissant ainsi comme un récepteur de l'Ag.

Le tableau 1 récapitule les fonctions effectrices des différentes classes d'Ig.

	IgA1	IgA2	IgD	IgE	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	IgM
Cytotoxicité (ADCC)	++	++	-	++	+++	+	+++	+	-
Phagocytose (ADCP)	++	++	-	-	+++	-	+++	+	+
Complément (CDC)	+	+	-	-	++	+	+++	-	+++

Tableau 1 : Les différentes fonctions effectrices en fonction des classes et sous-classes d'Ig

II. Production des anticorps monoclonaux

1. Historique et techniques

Une avancée majeure a eu lieu en 1975 lorsque César Milstein et Georges Köhler ont décrit une méthode permettant de générer de grandes quantités d'Ac monoclonaux (AcM) d'une seule spécificité prédéfinie. Leur méthode consistait à générer un hybridome à partir de la fusion de lignées cellulaires de myélome de souris avec des lymphocytes B provenant de la rate de souris.¹⁰ C'est ainsi que les AcM de premières générations sont nés, avec l'arrivée du premier Ac monoclonal thérapeutique entièrement murin en 1984, le muromonab (Figure 7A).

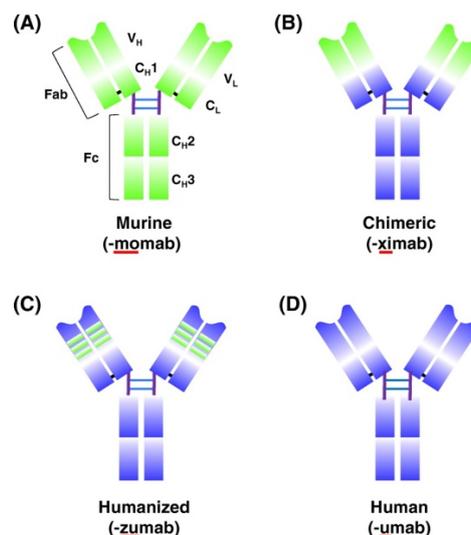


Figure 7 : Structure des Ac en fonction de leur caractéristiques murines et humaines¹¹

Néanmoins, l'utilisation thérapeutique de ces Ac s'est avérée décevante en raison d'une immunogénicité trop importante avec la production d'HAMA (*Human anti-mouse antibody*). Pour contrecarrer ce problème, est née l'idée de créer des Ac chimériques humains, dans lesquels les parties constantes des chaînes lourdes et légères des Ig d'origine murine ont été remplacées par des régions constantes d'origine humaine (Figure 7B).

En utilisant la méthodologie de l'ADN recombinant, il a été associé des gènes codants pour la région variable murine d'une lignée cellulaire de myélome à un gène codant pour la partie constante d'une immunoglobuline humaine.¹² Ainsi cette technique permet de produire des Ac hybrides, ou chimériques, constitués à 75% de séquences humaines de l'immunoglobuline¹³. Ces techniques mises au point dans les années 80, ont permis de produire des Ac chimériques notoires, tels que le rituximab et l'infliximab.¹⁰

Le troisième chapitre dans l'histoire du développement des Ac a été la production d'Ac dits humanisés (Figure 7C). Ces Ac sont composés à 90% de séquences humaines avec les régions hypervariables (CDR) d'origine murine. Ils sont obtenus par greffage de ces CDR murins sur les régions Framework des VH et VL humaines.¹⁴ (Figure 8)

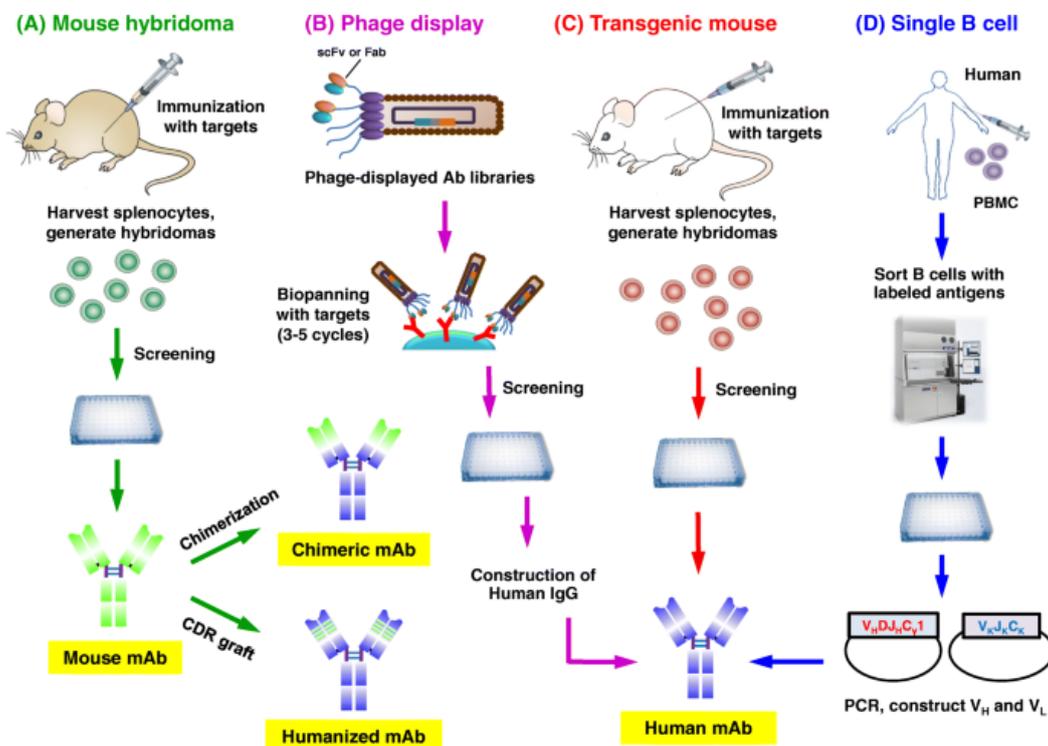


Figure 8 : Différents modes de production des Ac en fonction de leur degré d'humanisation ¹¹

Une autre technique d'humanisation, nommée « resurfacing », se base sur la modification des acides aminés du domaine variable murin afin de lui conférer un caractère plus « humain »¹⁵. Le premier Ac humanisé qui a vu le jour grâce à cette technique en 1997 fut le daclizumab, qui cible le récepteur de l'IL-2.

Ensuite, le challenge a été de produire des Ac totalement humains (Figure 7D). Pour ce faire, il existe trois techniques principales (Figure 8) : la technique du page display, la technique des souris transgéniques et la technique utilisant des lymphocytes B.

La technologie de *phage display*, développée par Sir G. P. Winter et G P. Smith dans les années 1990, est une technique *in vitro* qui se base sur l'utilisation de banque de gènes humains pouvant être intégré à un phage qui sera par la suite lui-même intégré dans la bactérie *E. coli*. C'est-à-dire que la bactérie est infectée par le phage filamenteux ce qui permet, suite à l'incorporation de l'ADN au sein du matériel génétique de la bactérie, l'expression de la protéine qui se trouve être, dans ce cas, un Ac humain. Cette technologie est à l'origine de la production de l'adalimumab.

La seconde technique, datant de 1994, se basant sur l'utilisation de souris « humanisées » transgéniques, a permis de créer par génie génétique des souris pour qu'elles produisent des Ac humains à la place de leurs Ac murins naturels grâce à l'introduction de gènes humains.¹⁶ A la suite d'une immunisation par un Ag donné, des Ac humains spécifiques pourront donc être obtenus . Le panitumumab, ciblant l'EGFR a été mis sur le marché dans les années 2000 grâce à cette technique.

Pour finir, la génération d'Ac humains neutralisants à partir de cellules B humaines¹⁷ a également donné des résultats prometteurs pour la thérapie des maladies infectieuses. À partir de donneurs infectés ou vaccinés, les lymphocytes B sont isolés et sélectionnés par cytométrie en flux afin de les fusionner avec des cellules de type myélome, ou un partenaire viral pour produire les Ig souhaitées.

2. Les variants des anticorps monoclonaux

Lors du développement de médicaments impliquant un Ac, de nombreux facteurs ayant un impact sur les fonctions biologiques et thérapeutiques recherchées de l'Ac sont à prendre en compte. La structure primaire et tertiaire des régions variables d'Ac a un impact sur la nature de l'interaction Ag-Ac, y compris la spécificité, l'affinité et l'immunogénicité. Des facteurs tels que la sous-classe d'Ac et l'allotype affectent la structure des régions constantes, ce qui influence la liaison aux récepteurs Fc impliqués dans la fonction effectrice et la demi-vie sérique. (Figure 9)

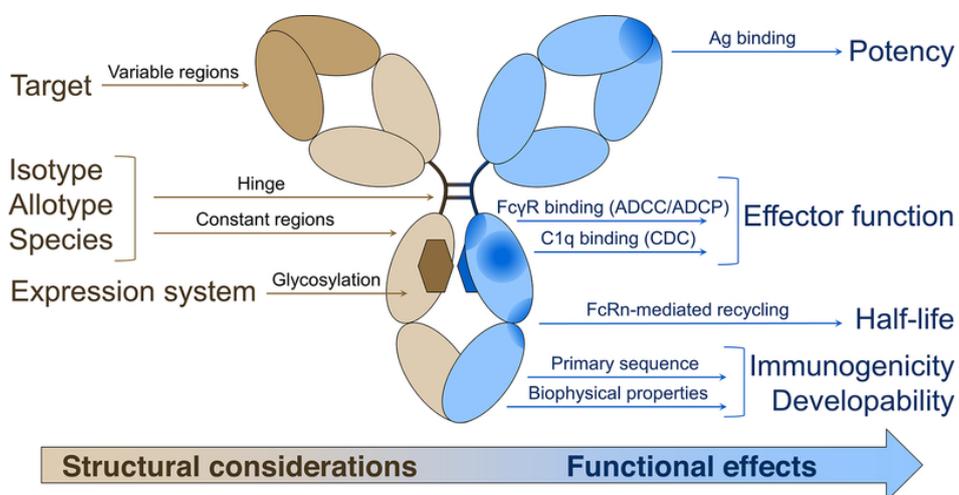


Figure 9 : Relation structure fonction d'un Ac* ⁸

* figure modifiée

Actuellement, environ 1200 Ac sont en cours d'études cliniques et approximativement 200 sont en cours d'examen réglementaire ou approuvés. ¹⁸ Parmi ces nouveaux Ac, à côté des AcM classiques, de nombreux dérivés des Ac ont été développés afin d'optimiser leurs propriétés. Ces modifications ont pour objectif de moduler leur immunogénicité, leur pharmacocinétique ou leur mode d'action.

a. Ingénierie de la partie Fc de l'anticorps

Afin d'améliorer l'efficacité des anticorps, des études ont eu comme objectif de moduler la capacité des Ac à interagir avec les composants humoraux et cellulaires du système immunitaire par le biais de l'ingénierie Fc.¹⁹ Une des voies est l'amélioration de l'interaction avec le récepteur activateur Fc γ R111a. Une étude a démontré qu'il était

possible d'optimiser la liaison du trastuzumab avec le récepteur activateur FcγRIIIa en réalisant des mutations au niveau des acides aminés 230-240 de la partie carboxy-terminale de la région charnière. Il est intéressant de noter que ces mutations n'entraînent pas d'augmentation de fixation sur le récepteur inhibiteur FcγRIIb.²⁰ Ces mutations ont permis d'améliorer l'ADCC, l'affinité pour les récepteurs FcγR et ainsi d'améliorer les fonctions effectrices de l'anticorps.

Le FcγRIIa est généralement retrouvé au niveau des polynucléaires neutrophiles, des monocytes, des macrophages et des cellules dendritiques. Son optimisation a été étudiée et il a été montré qu'une mutation Gly236Ala permet d'améliorer l'affinité de l'IgG1 pour le FcγRIIa, sans augmenter celle du FcγRIIb.²¹ Ainsi, l'ADCC peut être potentialisée *in vitro* et se cumuler avec d'autres mutations qui favorisent l'ADCC.

D'autres stratégies ont été développées avec la glyco-ingénierie.¹⁹ Par exemple, les interactions des Ig avec les FcγRs et C1q dépendent de la charnière, de la séquence d'acides aminés CH2 proximale, ainsi que de la glycosylation de l'acide aminé N297 présent dans cette région. Ainsi, des modifications au niveau de la composition glucidique de cette N-glycosylation influence grandement les fonctions effectrices des FcγRs et du complément. L'obinutuzumab, anti-CD20 et mogamulizumab, anti-CCR4, sont des exemples d'Ac modifiés par glyco-ingénierie qui ont été approuvés.

A l'inverse de potentialiser la fonction effectrice des Ig, il a également été développé une ingénierie afin de diminuer cette fonction, par exemple pour empêcher la mort des cellules cibles ou la sécrétion indésirable de cytokines.¹⁹

En outre, de nombreux patients recevant du muromonab, Ac anti-CD3 murin, indiqué dans la prévention de l'activation des lymphocytes T chez les patients transplantés, ont présenté des événements indésirables, dont l'induction de cytokines pro-inflammatoires qui a été attribuée en partie aux interactions de muromonab avec les FcγRs. Afin de réduire cette fonction effectrice involontaire, Bluestone *et al.* ont généré des variants qui ont tous montré une libération de cytokines inflammatoires réduite.

b. Les fragments d'anticorps

Le développement de fragments d'Ac, caractérisés par une plus petite taille et une affinité élevée, permettrait de faciliter l'accès à la cible, comme une tumeur ou une cible intracellulaire. Sur le principe de la digestion enzymatique de l'Ac (en utilisant par exemple la papaïne ou la pepsine) ou sur le principe du génie génétique, il est possible de produire un fragment d'Ac, d'une taille généralement comprise entre 10 et 100 kDa. (Figure 10)

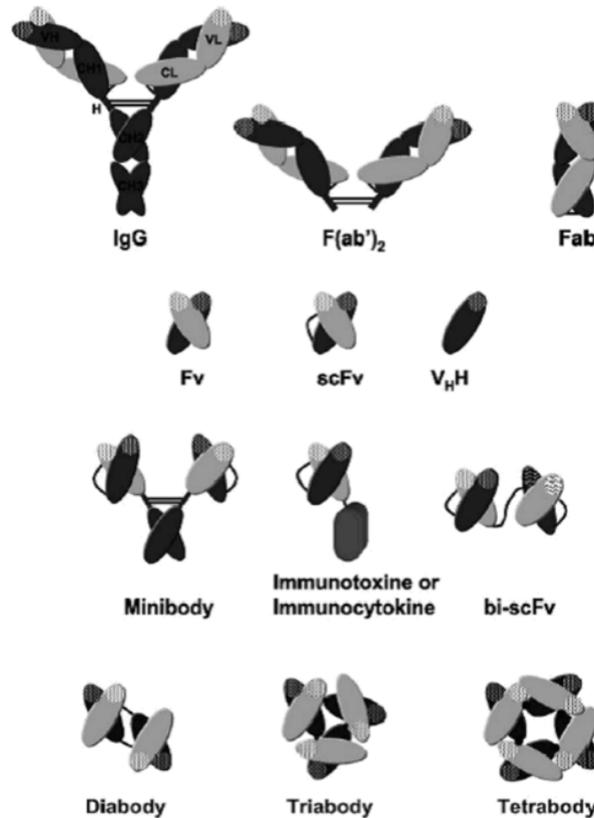


Figure 10 : Différents types d'Ac et fragments d'Ac²²

La diminution de taille permet de diminuer, voire d'éviter, l'accumulation au niveau du foie et donc leur métabolisation. Toutefois, les formes les plus petites peuvent se retrouver au niveau du rein secondairement à des mécanismes de filtration/réabsorption. Un faible poids moléculaire permet une meilleure pénétration dans les tissus. Néanmoins, les fragments d'Ac sont en général moins affins et surtout moins avides que les Ac entiers, avec des constantes de dissociation beaucoup plus élevées. On peut au final alors observer une diminution du ciblage tumoral (Figure 11).

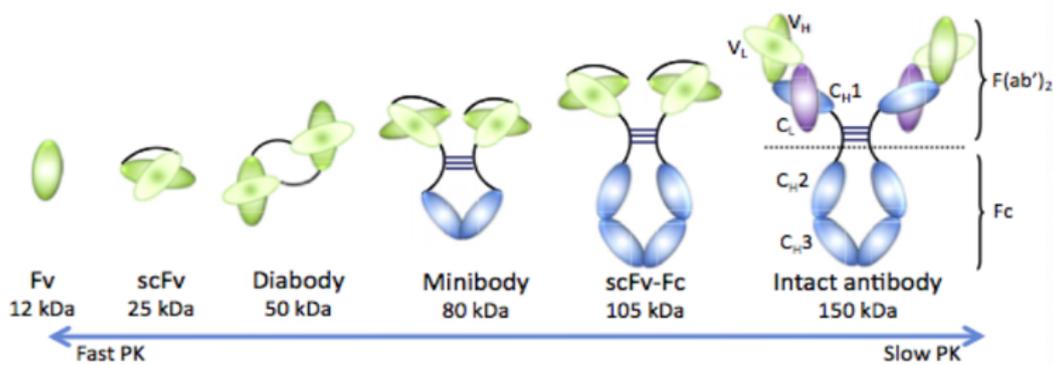


Figure 11 : Les différents types d'Ac, de l'Ac entier au fragment Fv, et leur impact sur leur pharmacocinétique²³

- **Les fragments Fab'2 et Fab**

La digestion enzymatique par la papaine permet d'obtenir des fragments Fab de poids moléculaire de 55 kDa. La voie enzymatique de la pepsine permet, quant à elle, d'obtenir le fragment F(ab')₂ de poids moléculaire de 110kDa. Ils existent également d'autres fragments d'Ac obtenus par ingénierie moléculaire, dont les fragments Fv.

- **Les fragments scFv (single-chain-Fragment-variable)**

Les scFv sont constitués des régions variables de chaînes lourdes et légères reliées par un peptide de liaison, leur poids moléculaire est d'environ 25kDa.

En raison de leur petite taille, l'immunogénicité des fragments scFv est faible et ils présentent une grande capacité à diffuser dans les tissus. ²⁴ .

- **Minibody (scFv-CH3)**

Le minibody est un fragment dimérique de 75 kDa, composé de deux monomères scFv reliés par une région constante (CH3).

- **Les fragments multivalents scFvs : Diabody, Triabody et Tetrabody**

A partir des fragments scFv il est possible de construire différents types d'Ac, le diabody est l'association de deux scFv, d'un poids de 50 kDa, il présente alors deux sites de liaison. L'association en trimère (triabody : 75 kDa) ou en tétramères

(tetrabody : 110 kDa) est également possible. Du fait de leur poids moléculaire augmenté, la demi-vie est deux à trois fois plus longue que les scFv. Au niveau rénal, il est observé une forte rétention, et une possible coupure protéolytique du peptide de liaison est possible, pouvant alors entraîner une réponse immune. ²⁵

- **Single domain antibody / Nanobody**

Les nanobodies ou les SdAb (single domain antigen binding) sont caractérisés par un poids moléculaire d'environ 15kDa. Ils représentent alors les plus petits fragments fonctionnels liant l'Ag d'origine naturelle.

Ils sont composés d'un seul domaine dépourvu de chaîne légère et dont le site de liaison de l'Ag se situe uniquement dans l'extrémité N-terminale de la chaîne lourde (domaine VHH). Un pont disulfure additionnel peut être également retrouvé au sein des VHH dont le rôle serait de stabiliser leur structure en l'absence de chaîne légère. Ces SdAb possèdent des caractéristiques pharmacodynamiques, telles que l'affinité et la spécificité, comparables à celles des AcM entiers.

Actuellement, l'enjeu majeur de ces Ac est le développement de thérapies ciblant des virus, tels que le virus de l'immunodéficience humaine-1 (VIH-1), le virus de la grippe A, le virus respiratoire syncytial (RSV), le virus de l'hépatite C (VHC) et les virus entériques ²⁶. Lorsque les nanobodies présentent une bonne solubilité on parle d'intrabodies car ils seraient capables de cibler des Ag intracellulaires. ²⁷ Des associations de nanobodies sont actuellement en développement, tel que l'ozoralizumab (TS-152), dans la polyarthrite rhumatoïde, qui est un Ac humanisé composé de trois NANOBODY@VHH, dont deux ciblent le facteur de nécrose tumorale (TNF) Ag pertinent pour la maladie et une cible l'albumine sérique humaine, ce qui prolonge la demi-vie sérique de la molécule.

- c. Les anticorps bispécifiques

Plus récemment, le développement d'Ac bispécifiques offre de nouvelles opportunités dans l'immunothérapie comme le recrutement des cellules effectrices cytotoxiques du système immunitaire pour cibler les cellules pathogènes.²⁸ Un Ac bispécifique est composé de deux paratopes (tels que Fabs ou scFvs) spécifiques de deux Ag différents ou de deux épitopes différents d'un même Ag. Différentes techniques pour

produire ces Ac ont été mises au point. La première se base sur un couplage chimique de fragments d'AcM²⁹. La seconde technique se base sur la fusion de deux hybridomes différents permettant d'obtenir la formation de cellules hybrides voir quadromes. Cette technique permet d'obtenir différents isotypes d'Ac, une étape de criblage est alors nécessaire pour obtenir l'Ac souhaité.³⁰ Le premier Ac bispécifique approuvé en Europe fût le catumaxomab en Europe en 2009.³¹

d. Les anticorps couplés

Il est possible d'ajouter des propriétés additionnelles aux AcM en les couplant à des agents tels que par exemple des radioisotopes, des drogues ou des enzymes (abzymes) (Figure 12).

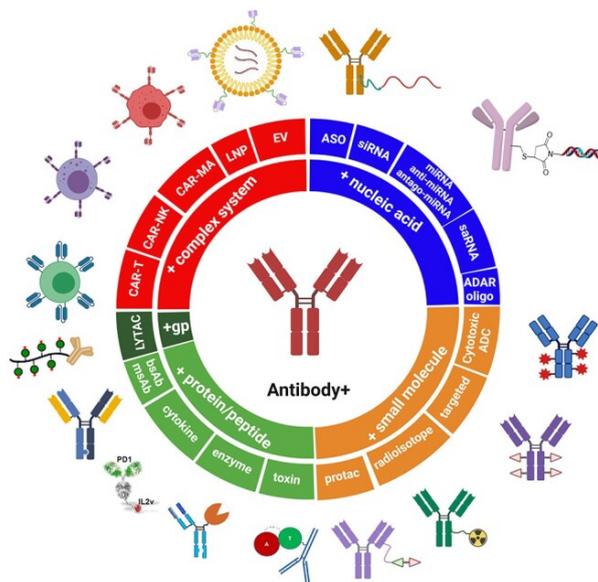


Figure 12 : Les catégories et sous-catégories de produits thérapeutiques³²

Plusieurs Ac conjugués ont reçu une autorisation de mise sur le marché (AMM) dans l'indication des tumeurs solides. Un des plus anciens est le trastuzumab-emtensine en 2014. Le sacituzumab-govitecan, ciblant le TROP-2 dans le cancer du sein triple négatif, est arrivé plus récemment, en 2021. En 2023, un nouveau conjugué du trastuzumab est apparu, le trastuzumab-deruxtecan, indiqué pour le traitement des cancers du sein et de l'estomac, et ses indications devraient s'étendre à d'autres localisations tumorales.

Le couplage des Ac avec des radioisotopes sera plus approfondi dans la suite de la thèse. Succinctement, dès les années 1970, l'utilisation d'Ac polyclonaux, marqués

avec des radionucléides, a été développée afin de localiser par imagerie des marqueurs tumoraux dans des modèles animaux. L'arrivée des AcM et le développement des techniques d'imagerie ont permis d'étendre ces recherches chez l'homme. Plusieurs Ac ou fragments d'Ac ont ainsi été développés pour la radio-immuno-imagerie.³³ De plus, en fonction de la nature du radionucléide choisi, une application thérapeutique est également possible, on parle alors de Radio-Immuno-Thérapie (RIT).

3. Pharmacocinétique des anticorps monoclonaux et variants d'anticorps

a. Absorption

Les AcM sont généralement administrés par voie intraveineuse (IV), mais de plus en plus d'Ac peuvent être administrés par voie sous-cutanée ou intramusculaire pour le confort du patient, tel que l'adalimumab et le pavalizumab.

Après administration sous-cutanée, l'absorption est assez lente avec un pic survenant environ une semaine après l'injection, la fraction absorbée étant entre 50 et 100% de la dose. Quelques Ac sont caractérisés par une voie d'absorption plus originale, tel que le ranibizumab ou le bevacizumab qui sont des fragments d'Ac humanisé anti-VEGF administrés directement dans l'œil pour le traitement de la forme humide de la DMLA, ou également l'omalizumab qui peut être inhalé grâce à la présence de FcRn dans les poumons.

b. Distribution

Suite à une administration IV, les concentrations sanguines d'AcM décroissent de façon bi-exponentielle correspondant à un modèle bicompartimental : une phase de décroissance rapide (correspondant à la distribution) précédant une phase de décroissance plus lente (correspondant à l'élimination). De par leur poids moléculaire élevé et leur hydrophilie, les AcM pénètrent faiblement dans les tissus et sont très présents dans la circulation sanguine et les liquides extracellulaires.

La phase de distribution de l'Ac peut être complexe à étudier. En effet, l'intensité de la captation d'un tissu, ou également d'une tumeur peut être inversement proportionnelle à l'affinité de l'Ac pour son Ag. Ce phénomène est appelé « barrière du site de

fixation ». Il s'explique par la rétention de l'Ac par les Ag secondaires présents en périphérie qui entrent en compétition avec les Ag cibles sur le tissu.³⁴ De plus, lorsque l'Ac est éliminé de façon significative par la fixation sur sa cible, son volume de distribution est difficile à estimer par les méthodes conventionnelles.³⁵ La distribution est donc déterminée par la physiologie de la cible et les caractéristiques de l'Ac et peut être également conditionnée par la présence ou non du FcRn sur les tissus.

En diminuant le poids moléculaire, il est possible d'offrir une distribution plus rapide et plus homogène qu'avec un Ac entier ;³⁶ Néanmoins, une distribution trop brève peut représenter une limite et diminuer la cytotoxicité de l'Ac. Pour contrecarrer ce problème, l'ajout d'un résidu de type polyéthylène glycol (PEG) permet d'augmenter la taille et de ce fait, la demi-vie d'environ 100 fois.³⁷ Un exemple de cette technique est le certolizumab pégol qui fait partie de la grande famille des anti-TNF α et dont la demi vie atteint 14 jours.

c. Élimination

Deux grandes voies d'élimination ont été mises en évidence (Figure 15) :

- Une **voie d'élimination endogène** : la pinocytose permet de capter les protéines circulantes dans le liquide interstitiel. L'élimination endogène des IgG fait intervenir le FcRn qui peut empêcher leur dégradation allongeant ainsi leur demi-vie d'élimination. Ce phénomène est saturable. Ainsi, lorsqu'un patient possède une concentration sanguine d'IgG approchant 100mg/mL³⁴, la demi-vie de l'IgG diminue de moitié et, inversement, en présence d'une très faible concentration, elle peut tripler. De plus, les fragments d'Ac tels que les Fab possèdent de par leur poids moléculaire plus faible, une demi vie raccourcie.

- Une **voie d'élimination spécifique de la cible antigénique**. Le complexe Ac-Ag est très stable. Il est éliminé par phagocytose pour les complexes circulants ou par le système réticulo-endothélial. Cette voie d'élimination est généralement caractérisée par une cinétique plus rapide que la voie endogène. Ce phénomène est saturable.

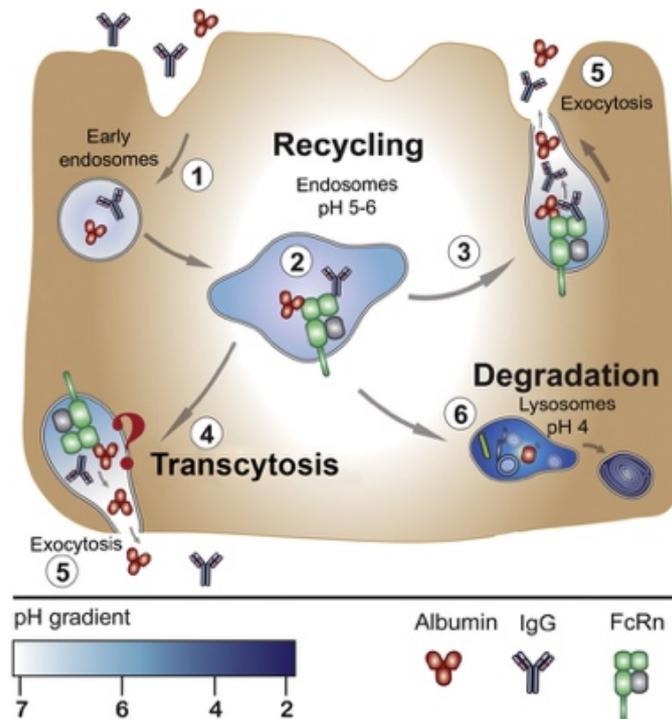


Figure 13 : Mécanismes d'élimination de l'Ac³⁸

Il est important de remarquer que l'élimination de l'Ac est dépendant de son poids moléculaire, des fragments seront donc plus vite éliminés que des Ac monoclonaux entiers.

III. Applications des anticorps monoclonaux

Les Ac sont devenus le *gold standard* dans la prise en charge de multiples pathologies. Nous pouvons compter presque 200 Ac approuvés dans le monde.

En effet, à la fin de l'année 2022, un peu moins d'une centaine de cibles sont impliquées dans le mécanisme de 162 thérapies par Ac dans le monde.

Les domaines de l'oncologie et de l'immunologie concernent la majorité des applications des Ac. (Figure 13)⁸

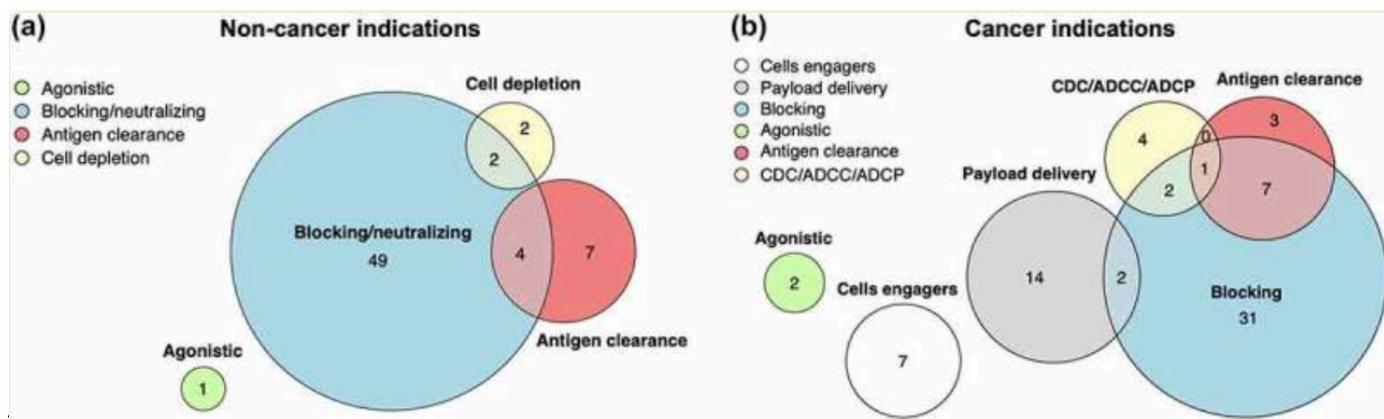


Figure 14 : Mécanismes d'action des Ac thérapeutiques dans les études cliniques de stade avancé*. Diagrammes d'Euler proportionnels à l'aire représentant les principaux mécanismes d'action des Ac dans les études cliniques de stade avancé. (a) Ac pour des indications non cancéreuses ; (b) Ac pour les indications de cancer. *Données au 1er octobre 2022

1. Cibles et modes d'action des anticorps

Au vu des multiples formats d'Ac thérapeutiques, il existe une multitude de mécanismes d'action.

Le mode d'action le plus courant est la fixation de l'Ac, par sa partie Fab, à un Ag tel qu'un ligand afin de bloquer son activité biologique, et d'éviter toute interaction au sein de l'organisme. Par exemple, la fixation du bevacizumab au VEGF libre empêche la cascade de signalisation et inhibe son action pro-angiogénique.

Il est aussi possible de bloquer des récepteurs, et ainsi empêcher la fixation d'un ligand, ce qui inhibe la cascade de signalisation responsable de la pathologie à traiter. C'est notamment le cas du tocilizumab et du cétuximab qui ciblent réciproquement le récepteur de l'IL6, responsable de réactions pro-inflammatoires, et le récepteur EGF-R impliqué dans la croissance de multiples tumeurs.³⁹ Les Ac ciblant les récepteurs peuvent également bloquer les processus d'homo et d'hétéro-dimérisation, activer des voies de signalisation entraînant l'internalisation du récepteur ou l'activation de l'apoptose de la cellule cible. C'est par ce mécanisme que le trastuzumab, anti-HER2, inhibe l'homodimérisation de HER2 et induit l'internalisation du récepteur.

Il est également possible de bloquer d'autres Ag membranaires, tels que des canaux ioniques, des transporteurs, des Ag viraux ou microbiens. Par exemple, le pavilizumab est une IgG1 qui se fixe sur la protéine F de l'enveloppe virale.

Le fragment Fc de l'Ac et son récepteur FcγR (FCGR), présent sur différents types de cellules immunitaires, permettent de déclencher différentes réponses immunitaires

cytotoxiques : l'ADCC, l'ADCP grâce à l'interaction Fc/FcγR, et la CDC avec le Fc/C1q. Ces différents modes d'action sont à l'origine de l'effet thérapeutique de l'Ac monoclonal, mais ils peuvent également être à l'origine des effets indésirables. Il est à noter que l'interaction de la région Fc avec le système immunitaire dépend de l'isotype de l'Ac, et que l'isotype IgG1 possède la meilleure activité cytolytique.

Pour finir, des travaux récents ont montré que la destruction des cellules tumorales par les Ac pouvait permettre de développer une immunité cellulaire ciblée contre des antigènes tumoraux. C'est-à-dire que suite à la phagocytose des fragments de cellules tumorales par des cellules dendritiques, et à leur présentation aux lymphocytes T, une réponse immune adaptative cellulaire et humorale ciblée contre la tumeur sera développée.⁴⁰

Afin d'améliorer la réponse du système immunitaire aux Ac monoclonaux, de nouvelles fonctions ont été développées dont le couplage d'Ac. Les ADC peuvent délivrer sélectivement des médicaments à petites molécules hautement cytotoxiques directement aux cellules cancéreuses ciblées, et ainsi induire leur apoptose. Les Ac monoclonaux peuvent aussi être couplés à des radioéléments, formant ainsi des radioimmunoconjugués dans un but de radiothérapie ciblée ou diagnostique.

Les Ac bispécifiques peuvent quant à eux, se lier simultanément à deux Ag différents. Par exemple, un lymphocytes T bispécifique (BiTE), composé d'un bras ciblant le CD3 sur les lymphocytes T et d'un bras reconnaissant les protéines cibles sur les cellules tumorales, est capable d'activer les lymphocytes T pour tuer les cellules tumorales.⁴¹

42

2. Effets indésirables et limites des anticorps monoclonaux

Bien que l'humanisation des Ac ait permis de diminuer drastiquement leur immunogénicité, différents types d'effets indésirables, parfois très graves et peu prévisibles, peuvent être observés. La toxicité des Ac peut être imputée à leur pharmacologie, c'est-à-dire dépendante de la cible, ou elle peut être indépendante de leur mécanisme d'action. De plus, en fonction du type d'Ac, c'est-à-dire, que ce soit un Ac entier ou un fragment, des effets indésirables spécifiques des différentes caractéristiques pharmacocinétiques et pharmacodynamiques peuvent être observés.

Ces effets toxiques peuvent être regroupés en cinq catégories : les infections opportunistes, le syndrome cytokinique, les pathologies auto-immunes, la toxicité d'organe, et l'immunogénicité.⁴³

Le risque infectieux est particulièrement retrouvé avec les anticorps dirigés contre des cibles du système immunitaire, par exemple le CD52, le TNF α ou l'intégrine VLA4. En effet, ils diminuent ainsi l'immunité anti-infectieuse, comme le natalizumab, anti-VLA4, indiqué dans la sclérose en plaque, qui peut entraîner des leucoencéphalites multifocales progressives, généralement chez les patients immunodéprimés. Cet effet indésirable est si grave qu'il a entraîné la suspension de cet Ac monoclonal, celui-ci a par la suite été en 2008 face à une balance bénéfice-risque favorable. Les Ac monoclonaux anti-TNF α sont également connus pour être responsables de complications infectieuses telles que la réactivation de tuberculose latente. Les anti-TNF α sont également impliqués dans l'apparition de pathologies auto-immunes secondaires à la production d'auto-anticorps anti-ADN ou anti-noyau induisant des complications de type lupus. D'autres Ac monoclonaux peuvent également être responsables de réactions auto-immunes, comme l'ipilimumab, immunomodulateur anti-CTLA4, qui augmente l'action et la prolifération des lymphocytes T, entraînant de possibles maladies auto-immunes telles que l'uvéite, le vitiligo ou l'entérocolite auto-immune.⁴⁴

De plus, l'injection des Ac peut entraîner une toxicité très connue appelée syndrome de relargage cytokinique (CRS) caractérisé par une réaction inflammatoire systémique sévère du patient avec des maux de têtes, des troubles digestifs, une vasodilatation et une hypotension. Ces réactions sont souvent observées lors de l'administration du rituximab, et peuvent être traitées par administration du tocilizumab.

Les Ac présentant une structure murine ou chimérique peuvent entraîner une réaction allergique (hypersensibilité, choc anaphylactique), un CRS, mais également une perte d'efficacité avec une augmentation de l'élimination de l'Ac.⁴⁵ L'humanisation des Ac a permis de diminuer grandement la survenue de ce type d'effets indésirables, néanmoins certains épitopes peuvent se révéler encore immunogènes au niveau de leur régions hypervariables, et entraîner alors des réponses de type HAHA qui peuvent réduire l'efficacité du traitement.

Dans d'autres cas, la structure de l'Ac n'est pas du tout responsable de la toxicité du traitement, mais c'est l'expression secondaire de l'Ag d'intérêt sur des tissus sains qui pose problème. Par exemple, le trastuzumab peut augmenter le risque d'insuffisance cardiaque et diminuer la fraction d'éjection ventriculaire gauche à cause des récepteurs HER2 présents sur le tissu cardiaque.⁴⁶

L'utilisation des Ac peut également être limitée par la variabilité inter-individuelle de la pharmacocinétique. Pour une même dose injectée, la concentration sérique de l'Ac peut varier d'un individu à l'autre, et entraîner une différence d'exposition au médicament influençant la réponse thérapeutique. L'adalimumab, le cétuximab, l'infliximab ainsi que le rituximab sont concernés par ce problème.⁴⁷

Le sexe et le poids du patient sont également des facteurs pouvant modifier la pharmacocinétique des Ac. Par exemple, le rituximab est sensible à la surface corporelle de l'individu, le bevacizumab est quant à lui influencé par le sexe des patients.⁴⁸

D'autres paramètres individuels peuvent entraîner des variabilités dans la réponse au traitement, comme l'albuminémie, la clairance rénale, la masse antigénique.⁴⁹

L'affinité d'un Ac peut varier d'un individu à l'autre en raison de l'expression de récepteur de basse affinité. En effet, 80% de la population exprime ce genre de variant.

Cette variabilité pharmacocinétique et clinique selon les patients suggère qu'il serait intéressant de disposer d'une technique permettant d'évaluer la cinétique des Ac et leur fixation chez les patients, afin d'améliorer la réponse à l'immunothérapie et de prédire l'efficacité, ainsi que les effets indésirables chez les patients. C'est dans ce cadre que l'immunoTEP pourrait trouver sa place.

Chapitre 2 : L'immuno-tomographie par émission de positons

I. La tomographie par émission de positons

1. Introduction

La médecine nucléaire est une spécialité médicale basée sur l'administration d'un médicament radiopharmaceutique, composé d'un vecteur couplé à un radionucléide, dans un but diagnostique ou thérapeutique.

Dans la cadre du diagnostic, un radionucléide émetteur de rayonnements γ ou β^+ sera utilisé. Selon le type d'émission, les modalités d'imagerie utilisées seront respectivement la Tomographie à Émission MonoPhotonique, (TEMP ou SPECT pour Single Photon Emission Computed Tomography) ou la Tomographie par Émission de Positons (TEP ou PET pour Positron Emission Tomography). Au cours des dernières années, la TEP, qui offre une meilleure résolution, une meilleure sensibilité, et permet la quantification de la fixation, s'est largement développée.

Cette technique d'imagerie est dite fonctionnelle car elle permet d'évaluer, de manière non invasive, l'activité métabolique ou moléculaire de cellules par la détection d'une émission provenant du radiopharmaceutique administré au patient.

La seconde spécialité de médecine nucléaire est la radiothérapie interne vectorisée (RIV), qui est définie par l'utilisation d'un radioélément émetteur β^- ou α , couplé à un vecteur, qui permet de délivrer une dose thérapeutique dans des cellules ciblées. Lorsque le vecteur est un Ac, on parle de radioimmunothérapie (RIT). Elle est à distinguer de la radiothérapie externe qui utilise une source d'irradiation extérieure au patient. L'avantage de la RIV est qu'elle permet d'acheminer l'isotope radioactif au plus près des cellules cibles, souvent des cellules cancéreuses, afin de potentialiser l'effet cytotoxique des rayonnements, et de minimiser les dommages aux tissus sains.

A la frontière de ces deux spécialités, s'inscrit une approche innovante appelée théranostique, qui combine la démarche diagnostique et la thérapie afin d'améliorer la prise en charge des patients et d'offrir une médecine personnalisée.

Il existe deux versants à la théranostique. Le premier, consiste en l'utilisation d'un vecteur, couplé dans un premier temps à un radionucléide à visée diagnostique pour

étudier l'expression moléculaire de la maladie. Puis, une fois cette expression documentée et validée, utiliser ce même vecteur, cette fois couplé à un radionucléide à visée thérapeutique permettant d'offrir un traitement ciblé au sein de la tumeur par RIV. Le second versant de la théranostique est un concept plus large basé sur le radiomarquage d'une molécule thérapeutique d'intérêt afin d'étudier sa fixation chez un patient donné, et de prédire la réponse au traitement compte tenu de l'expression de la cible. La molécule radiomarquée contribue donc au choix thérapeutique pour le patient.

2. Le médicament radiopharmaceutique

Un médicament radiopharmaceutique (MRP) se définit comme "tout médicament qui, lorsqu'il est prêt à l'emploi, contient un ou plusieurs isotopes radioactifs, dénommés radionucléides, incorporés à des fins médicales" (article L5121-1 du Code de Santé Publique).

Un MRP peut être constitué d'un radionucléide seul, ou d'un radionucléide couplé à un vecteur. En effet, la nature même du radionucléide peut permettre de l'utiliser sans passer par l'étape de couplage. Par exemple, l'affinité naturelle de l'iode pour la thyroïde permet d'utiliser son isotope radioactif, ^{123}I , pour réaliser une scintigraphie thyroïdienne.⁵⁰

Lorsque le radionucléide ne présente pas d'affinité naturelle pour la cible, il est nécessaire de le coupler à un vecteur qui permettra de vectoriser le radionucléide jusqu'à la cible d'intérêt, d'émettre le rayonnement au niveau de la cible d'intérêt, et ainsi de visualiser le fonctionnement d'un organe ou l'expression moléculaire à la surface de cellules.

Les vecteurs peuvent varier en fonction de la cible à étudier, il peut s'agir de petites molécules, comme le glucose, ou de grosses molécules, telles que des Ac. Il sera important de concilier la biodistribution du vecteur dans l'organisme, et la période du radionucléide qui y sera couplé. Le vecteur idéal associe une bonne spécificité et une affinité importante pour sa cible. La fraction libre du vecteur doit pouvoir être éliminée rapidement, afin d'obtenir une accumulation spécifique au niveau de la cible, telle

qu'une tumeur, et une clairance du radiopharmaceutique, permettant ainsi d'avoir un rapport cible/bruit de fond élevé.

Dans le développement d'un MRP, le choix du radionucléide repose sur la nature de son rayonnement et sur sa période. Mais d'autres contraintes rentrent également en jeu, comme la production du radioisotope, la pureté chimique et nucléaire, la radiotoxicité, l'isotope de décroissance, ainsi que la méthode de radiomarquage.

3. Les radionucléides

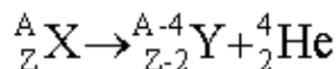
Chaque radionucléide est caractérisé par :

- Sa **période physique** qui est définie par le temps au bout duquel le nombre de noyaux radioactifs, ou l'activité, est diminué de moitié
- Ses **émissions**

Il est possible de diviser en deux catégories les types de rayonnements émis par les radionucléides : des rayonnements particuliers, α et β , et des rayonnements électromagnétiques γ . La nature des rayonnements émis conditionne l'application médicale, c'est-à-dire l'imagerie SPECT (rayonnement γ), l'imagerie TEP (rayonnement β^+) ou la RIV (rayonnement α , β^-).

▪ Émetteurs α :

Les radionucléides α se désintègrent en émettant une particule α correspondant à un noyau d'Hélium (He).



Ce type de rayonnement est très peu pénétrant dans la matière, de l'ordre de quelques micromètres, mais très ionisant. Son transfert linéique d'énergie (TEL), défini par la quantité d'énergie (eV) déposée par une particule par une unité de distance, c'est-à-dire l'effet biologique du rayonnement ionisant, est très élevé. Les particules α présentent un grand intérêt en RIV.

- **Émetteurs β^-**

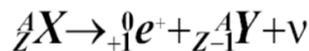
L'émission β^- consiste en la transformation d'un neutron en un proton avec émission d'un électron négatif et d'un antineutrino :



Elle est caractérisée par un TEL moins important que pour les α , mais une pénétration plus grande dans la matière, de l'ordre de quelques millimètres. Les électrons émis par désintégration β^- sont utilisés principalement en radiothérapie interne pour détruire les cellules cancéreuses.

- **Émetteurs β^+**

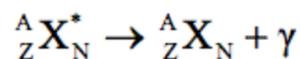
L'émission β^+ est défini par la transformation d'un proton en neutron, avec émission d'un positon et d'un neutrino :



Les positons, provenant de la désintégration β^+ , après avoir perdu leur énergie dans la matière, vont interagir avec des électrons conduisant au phénomène d'annihilation. Deux photons γ de 511keV sont alors émis simultanément en coïncidence. Ces 2 photons seront détectés en imagerie TEP.

- **Émetteurs γ**

L'émission γ est un phénomène de désexcitation du noyau, qui suit généralement une désintégration α ou β .



Les photons γ sont des rayonnements électromagnétiques. Il s'agit donc de rayonnements sans charge, ni masse qui ont un pouvoir pénétrant important et un TEL faible. Les photons seront détectés dans les gamma-caméras utilisés en SPECT.

4. L'imagerie TEP

Le principe de la TEP, mais également de la SPECT, repose sur la détection des rayonnements émis par un radiotraceur injecté au patient, qui pourront être convertis en image. La TEP est composée d'une couronne de détecteurs permettant d'interagir avec les photons γ d'annihilation émis par le MRP au sein du patient (Figure 16). Seuls

les rayonnement γ émis de façon opposés et arrivant avec un angle de 180° sur le détecteur sont intégrés dans la construction de l'image.

1. Injection du MRP	2. Imagerie TEP du patient	3. Construction des images	4. Analyse des images
-------------------------------	--------------------------------------	--------------------------------------	---------------------------------

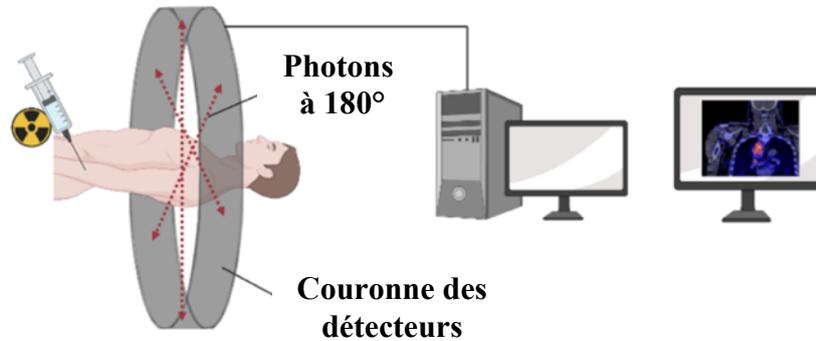


Figure 15 : Principe de l'imagerie TEP* ⁵¹

* figure modifiée

L'imagerie TEP est toujours associée à une imagerie anatomique, en général de type tomodensitométrie (TDM), on parlera de TEP-TDM. Le principe de la TDM se base sur l'émission de rayons X par une source externe, traversant le patient et étant plus ou moins absorbés en fonction de la densité du tissu. L'intensité d'absorption sera par la suite convertie en image anatomique.

L'association d'une image anatomique de TDM à l'imagerie fonctionnelle de la TEP permet d'améliorer le repérage du signal. La résolution de la TEP-TDM est de l'ordre de 4 à 7 mm en application clinique et de 1 mm en imagerie pré-clinique dans des modèles murins.

II. Intérêts et perspectives de l'immunoTEP

L'imagerie TEP dite phénotypique peut spécifiquement cibler des cellules en fonction de l'expression de marqueurs d'intérêt. Les vecteurs peuvent être de différents types. Lorsqu'il s'agit d'Ac ou de dérivés d'Ac, on peut parler d'immunoTEP. L'immunoTEP combine la sensibilité et la résolution de la TEP avec la spécificité de ciblage de l'Ac.

1. Les limites de la TEP métabolique

Le 2-désoxy-2-(¹⁸F) fluoro-D-glucose, ou fluorodésoxyglucose (FDG), est le MRP le plus utilisé en imagerie TEP, et ses indications sont très nombreuses en oncologie. Il s'agit d'un analogue du glucose radiomarké au fluor 18. Grâce à sa nature glucosique, il est métabolisé par les cellules avides de glucose : les cellules tumorales, cardiaques et du système nerveux central, sa captation s'en trouve alors augmentée. Après avoir été internalisé, le FDG est métabolisé en fluorodésoxyglucose-6-phosphate, qui se trouve dans une impasse métabolique permettant ainsi son accumulation dans la cellule. Néanmoins, l'intérêt du FDG comme vecteur en oncologie peut se révéler limité lorsque les cellules tumorales sont quiescentes ou en renouvellement lent (cas que l'on peut retrouver dans les tumeurs neuroendocrines, les cancers de la prostate, le myélome multiple...)^{52 53} De plus, le FDG n'est pas spécifique des cellules tumorales, et peut également se retrouver au niveau de lésions inflammatoires ou infectieuses.

Face à l'avidité en acides aminés de certaines tumeurs secondaires à leur métabolisme effréné, d'autres traceurs métaboliques ont été développés. Par exemple, la choline marquée au ¹⁸F, est indiquée dans l'imagerie des cancers de la prostate.

Néanmoins, face à des cellules cancéreuses quiescentes ou à renouvellement cellulaire lent, rencontrées dans le cancer de la prostate, dans les tumeurs neuroendocrines, ou le myélome par exemple, ces traceurs peuvent se révéler insuffisants.

Afin de pallier à ces problèmes, il est devenu nécessaire de développer de nouveaux vecteurs plus spécifiques. De ce fait, la place de l'immunoTEP se retrouve renforcée car elle pourrait permettre d'obtenir des images spécifiques d'une cible donnée.

2. État des lieux et intérêt de l'immunoTEP

A partir des années 70, des Ac polyclonaux conjugués avec des radionucléides se sont développés afin de visualiser des marqueurs tumoraux dans des modèles d'animaux.

L'application de ces nouveaux outils tourne autour de 3 axes : le diagnostic, la thérapie et la théranostique.^{54 55}

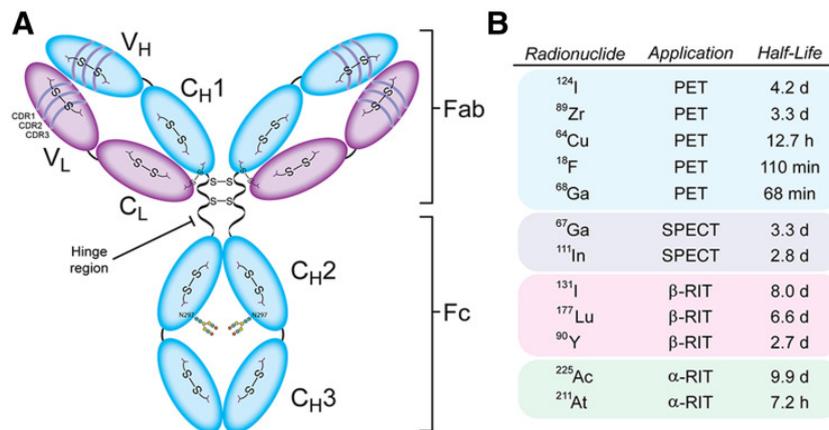


Figure 16 : Structure d'un Ac et les applications médicales du radiomarquage de l'Ac⁵⁶

Plusieurs résultats cliniques prometteurs ont été obtenus en radioimmunothérapie avec des Ac radiomarqués au ¹³¹I, ²²⁵Ac et ¹⁷⁷Lu, mais également en imagerie avec l'immunoTEP et le développement de marquages aux radiométaux (⁸⁹Zr...)⁵⁶

Pour la suite de cette thèse, nous nous concentrons sur l'application diagnostique voir théranostique des Ac radiomarqués.

Il existe actuellement peu d'Ac diagnostiques encore commercialisés.

En 1996, différents fragments d'Ac et une IgG entière ont été acceptés aux Etats-Unis et/ou en Europe.

L'imciromab (Myoscint®), fragment Fab ciblant la myosine, et radiomarqué à l'¹¹¹In était utilisé pour le diagnostic de l'infarctus du myocarde.⁵⁷ Le sulesomab (Leukoscan®) est un fragment Fab'-SH d'anticorps monoclonaux antigranulocytes murins. Il a été autorisé en 1997, et a été par la suite remplacé par le besilomab (Scintimun®) en 2010, dans la recherche de localisation d'une infection ostéoarticulaire après marquage au ^{99m}Tc.⁵⁸

Trois autres Ac avaient obtenus une autorisation pour une utilisation clinique. L'arcitumomab (CEA-Scan®), fragment Fab' marqué au ^{99m}Tc , était utilisé dans le diagnostic de récurrence de cancers colorectaux⁵⁹. Le nofetumomab (Verluma®), également marqué au ^{99m}Tc , était indiqué pour le diagnostic des cancers du poumon à petites cellules.⁶⁰ Pour finir, le capromab (Prostascint®) était une IgG marquée à l' ^{111}In indiqué dans le diagnostic des cancers prostatiques (liaison à l'Ag PSMA⁶¹). Un dernier Ac monoclonal était apparu sur le marché, l'ibritumomab (Zevalin®) marqué à ^{111}In , utilisé en pré-thérapeutique aux États-Unis, pour le diagnostic des lymphomes non-Hodgkinien^{62 63}, et qui fut par la suite marqué à l' ^{90}Y pour une utilisation thérapeutique aux États-Unis et en Europe. Il fut finalement retiré en 2020 en France.

A ce jour, le seul Ac possédant encore une AMM en France, dans le cadre d'une utilisation diagnostique SPECT, est le Scintimun®.

Toutefois, face à l'arrivée des nouvelles biothérapies à base d'Ac, et au développement de l'imagerie TEP, un nouvel essor dans la création d'Ac radiomarqués est observé, principalement dans des applications immunoTEP et théranostiques.⁶⁴

Parmi les Ac les plus étudiés et qui illustrent le développement des applications d'Ac radiomarqués, on peut citer le trastuzumab. C'est un Ac monoclonal bien connu, ciblant le récepteur 2 du facteur de croissance épidermique humain (HER2), et indiqué dans le cancer du sein métastatique HER +. Il n'est efficace que dans les tumeurs surexprimant le récepteur, ce qui correspond à environ 20% des cas. Il est actuellement recommandé d'établir le profil phénotypique de la tumeur, pour cela des tests immunohistochimiques sur biopsie sont réalisés.⁶⁵ Plusieurs inconvénients sont à noter : le côté invasif de la biopsie, le risque de prélever une zone non tumorale, l'expression phénotypique hétérogène et évolutive au cours du temps ou encore, l'accès difficile de la zone à biopsier. Tous ces inconvénients peuvent conduire au choix d'une thérapie inadaptée. Ainsi, l'immunoTEP peut se révéler être une méthode de choix pour étudier l'expression des récepteurs des cellules cancéreuses, avant et pendant le traitement. C'est dans ce contexte que le trastuzumab a été premièrement marqué au ^{89}Zr ⁶⁶, et qui est depuis en essai clinique, marqué avec le ^{64}Cu .^{67,68}

En outre, de nombreuses autres cibles sont explorées, notamment dans le domaine de la cancérologie, mais également dans de le domaine des pathologies inflammatoires. Parmi ces cibles, nous avons choisi dans ce travail de nous intéresser au PD-L1 et au récepteur à l'IL-6.

3. L'immunoTEP anti-PD-L1 en oncologie

Les immunothérapies ciblent les points de contrôle immunitaire (immune checkpoint) tels que le PD-1, le PD-L1 mais également le CTLA-4 (pour cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4). Ces points de contrôles immunitaires sont situés à la surface des lymphocytes T, et leur rôle est de moduler la réponse immunitaire. La voie des immune checkpoint est primordiale pour limiter la durée et l'intensité de la réponse immunitaire afin d'éviter notamment des phénomènes d'auto-immunité. Certains cancers sont capables de jouer avec ce mécanisme pour ne pas être attaqués par l'organisme. Les inhibiteurs des immunes *checkpoints* (ICI) inhibent donc les signaux inhibiteurs des cellules tumorales sur les CPA et lymphocytes T, activant ou réactivant ainsi une immunité anti-tumorale. (Figure 17)

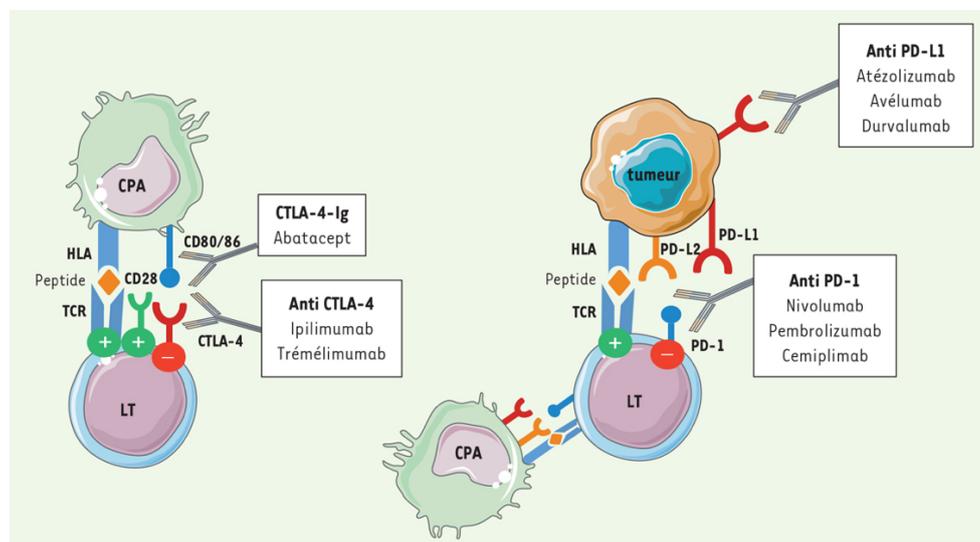


Figure 17 : Représentation des mécanismes d'action des inhibiteurs de checkpoint ⁶⁹

Ces immunothérapies ont représenté une véritable révolution dans le traitement contre le cancer, dont l'efficacité a été démontrée sur un large éventail d'indications comme le mélanome, le lymphome, le cancer pulmonaire non à petites cellules (CPNPC), mais également les cancers du rein, de la vessie, et ORL.⁷⁰ Certains patients ont présenté

une réponse prolongée grâce au développement d'une réponse immunitaire mémoire capable de lutter durablement contre le cancer, même après l'arrêt du traitement. Grâce à ce succès, James Allison et Tasuku Honjo se sont vu remettre en 2018 le prix Nobel de physiologie et de médecine pour leurs travaux sur les inhibiteurs des *checkpoint* immunitaires, CTLA-4 et PD-1.

Néanmoins, malgré de très bonnes réponses cliniques chez certains patients, le taux de succès avec des immunothérapies par anti-PD-1/anti-PD-L1 plafonne autour de 20 % pour les patients atteints de CPNPC.⁷¹ De plus, ces immunothérapies anti-PD-1/anti-PD-L1, comme tout traitement, peuvent entraîner des effets indésirables potentiellement graves dont des pneumopathies, des colites, hépatites ou pancréatites⁷². Ceci met en évidence la nécessité de mettre en place des biomarqueurs prédictifs de leur efficacité clinique et de leur tolérance propre au patient. De nos jours, l'étude de l'expression de PD-L1 au sein de la tumeur par immunohistochimie est la seule technique approuvée pour la prédiction de la réponse aux Ac anti-PD-1/anti-PD-L1.

Cependant, des études ont montré que l'expression de PD-L1 n'est pas corrélée à la réponse à l'immunothérapies anti-PD-1/anti-PD-L1. En effet, une étude rétrospective de 7 essais cliniques de patients atteints de CPNPC a mis en évidence qu'environ 23 % des patients présentant des tumeurs PD-L1+ ont montré une réponse positive aux anti-PD-1/anti-PD-L1.⁷¹

C'est dans ce contexte que s'inscrit le potentiel de l'imagerie TEP qui pourrait offrir un axe d'amélioration dans le traitement par immunothérapies anti-PD-1/anti-PD-L1. Ainsi une grande diversité de radio ligands anti-PD-L1 ont été développés. (Tableau 2).

Ac anti-PD-L1	Radionucléide	Modèle tumoral	Référence
Études pré-cliniques			
Atezolizumab	⁶⁴ Cu	CSTN humain orthotopique Cancer sein murin orthotopique	Lesniak <i>et al.</i> , 2016
Atezolizumab C4	⁸⁹ Zr	CPNPC humain sc. Mélanome murin sc.	Moroz <i>et al.</i> , 2018
Atezolizumab	⁸⁹ Zr	Cancer poumon humain sc.	Ehlerding <i>et al.</i> , 2019
Atezolizumab	⁸⁹ Zr	Modèle PDX tumeur rénale orthotopique	Vento <i>et al.</i> , 2019
Avelumab	⁸⁹ Zr	CSTN humain sc.	Jagoda <i>et al.</i> , 2019
Avelumab	⁸⁹ Zr	CSTN humain sc.	Li <i>et al.</i> , 2020
C4	⁸⁹ Zr	CPNPC, cancer de la prostate humain sc. Modèle PDX CPNPC sc Mélanome murin sc.	Truillet <i>et al.</i> , 2018
MX001	⁶⁴ Cu	Glioblastome et cancer gastrique humains sc. Cancers sein et colon murins sc.	Xu <i>et al.</i> , 2018
6E11	⁸⁹ Zr	CPNPC humain sc. Mélanome et cancer colon murins sc.	Christensen <i>et al.</i> , 2020
CX-075 Probody CX-072	⁸⁹ Zr	CSTN humain sc. Cancer colon murin sc.	Giesen <i>et al.</i> , 2020
SHR-1316	¹²⁴ I	Modèle PDX CPNPC sc.	Wen <i>et al.</i> , 2020
REGN3504	⁸⁹ Zr	Cancer poumon CSTN humain sc. Souris humanisées hPD-1+ / hPD-L1+	Kelly <i>et al.</i> , 2021
10F.9G2	⁶⁴ Cu	Mélanome murin	Hettich <i>et al.</i> , 2016
10F.9G2	⁸⁹ Zr	CETEC et mélanome murin sc.	Kikuchi <i>et al.</i> , 2017
10F.9G2	⁶⁴ Cu	Cancer du pancréas murin sc. Et orthotopique	Zhao <i>et al.</i> , 2020
Y003	⁸⁹ Zr	Cancer colon murin sc.	Ren <i>et al.</i> , 2021
Nb6	⁶⁴ Cu	Cancer poumon murin sc.	Jiang <i>et al.</i> , 2020
Atezolizumab	⁸⁹ Zr	Cancer du sein (triple négatif)	Massicano <i>et al.</i> , 2023
Études cliniques			
Atezolizumab	⁸⁹ Zr	CPNPC, CSTN et cancer prostate avancés, avant traitement avec atézolizumab	Bensch <i>et al.</i> , 2018
Atezolizumab	⁸⁹ Zr	Carcinome rénal	Mulgonkar <i>et al.</i> , 2022
Durvalumab	⁸⁹ Zr	Cancer poumon non à petites cellules	Hegi-Johnson <i>et al.</i> , 2023

Tableau 2 : Revue bibliographique des études pré-cliniques et cliniques des Ac anti-PD-L1 radiomarqués

Certains Ac, capables de cibler à la fois le PD-L1 humain et murin, comme l'atézolizumab et l'IgG C4, ont été étudiés par immunoTEP chez des souris immunocompétentes portant des tumeurs murines syngéniques. Ces études immunoTEP chez des souris immunocompétentes ont permis de mettre en évidence l'impact de l'expression de PD-L1 dans les tissus sains sur la biodistribution de l'Ac anti-PD-L1.

Des modèles basés sur l'implantation de lignées cancéreuses humaines en hétérotopique ou orthotopique chez des souris immunodéficientes ont été réalisés. Par exemple, l'Ac IgG C4 radiomarqué au ^{89}Zr a été capable de refléter l'expression de PD-L1 dans des souris porteuses de tumeurs murines sous-cutanées de mélanome ^{73,74}. Afin d'obtenir des modèles de tumeurs plus représentatives de la physiopathologie du cancer chez l'homme, des modèles de xénogreffes dérivées de la tumeur du patient (modèles PDX pour « patient-derived xenograft »)^{75,76} ont permis d'affiner l'étude des Ac car ils représentent plus fidèlement la tumeur originelle du patient. L'étude de Massicano *et al*, a permis de développer et optimiser l'utilisation du ^{89}Zr -Atezolizumab à l'aide des modèles PDX : la distribution tumorale de l'Ac a été quantifiée et a révélé le potentiel de l'Ac dans la détection non invasive des tumeurs (provenant de cancer du sein triple négatif) PD-L1 positives, et la possibilité de réaliser une évaluation quantitative et longitudinale.

La spécificité du ^{64}Cu -atezolizumab a été confirmée dans des modèles tumoraux orthotopiques de cancer du sein humain (MDAMB231 et SUM149) et dans un modèle de carcinome mammaire syngénique de souris (4T1). Une accumulation spécifique du ^{64}Cu -atezolizumab a également été observée dans les tumeurs à forte expression de PD-L1 (CHO-hPD-L1 et MDAMB231) par rapport aux tumeurs à faible expression de PD-L1 (CHO, SUM149). Collectivement, ces études démontrent la faisabilité d'utiliser le ^{64}Cu -atezolizumab pour la détection de l'expression de PD-L1 dans différents types de tumeurs. ⁷⁷

Plus récemment, des affibodies Z-PD-L1, d'un poids moléculaire d'environ 7kDa, ont été radiomarqués au ^{18}F ou ^{68}Ga dans des xénogreffes humaines de tumeurs PD-L1+, et ont montré une accumulation rapide et spécifique dans les sites ciblés.⁷⁸ Dans d'autres études portant sur le glioblastome, les affibodies ont démontré une nouvelle fois leur capacité à s'accumuler au niveau des tumeurs cérébrales. ⁷⁹

La première étude clinique immunoTEP ciblant le PD-L1 a été réalisée avec l'atézolizumab radiomarqué au ^{89}Zr (Figure 19), parmi 22 patients atteints de CPNPC, de cancers de la prostate, et de cancers du sein triple négatif (CSTN) avancés, avant qu'ils ne soient traités avec cet Ac thérapeutique.⁵¹ Cette étude a permis de montrer l'hétérogénéité de l'expression de PD-L1 au sein d'une même tumeur, mais également dans l'ensemble des tumeurs d'un même patient.

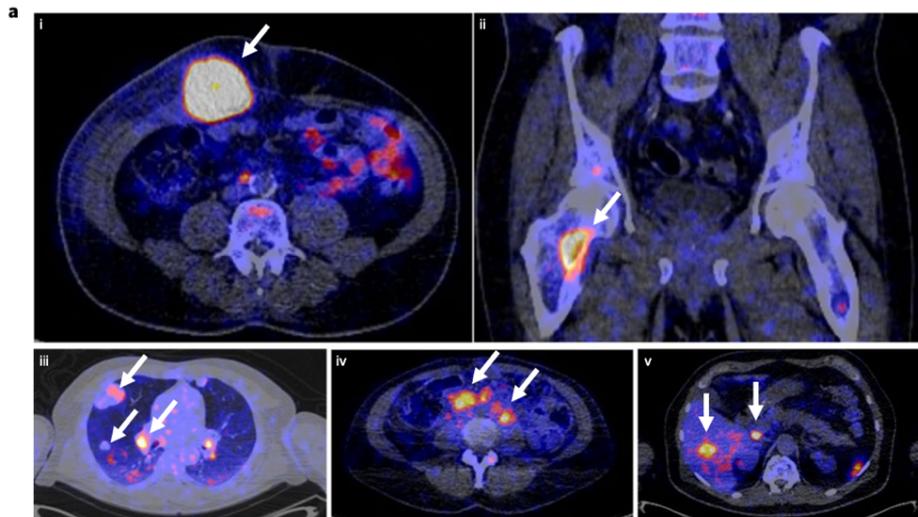


Figure 18 : Fixation tumorale de l'atézolizumab radiomarqué au ^{89}Zr chez 5 patients⁵¹

Face à cette hétérogénéité qui complexifie la prise en charge des patients, l'étude de David Leung et *al*, utilisant un Ac anti-PD1 radiomarqué au ^{89}Zr , mais également une adnectine anti-PD-L1 marquée au ^{18}F , a démontré que l'expression tumorale PD-L1 et PD-1 peut être quantifiée de manière non invasive à l'aide de la TEP-TDM chez les patients atteints d'un CPNPC. Les auteurs ont ainsi montré que l'expression de PD-1 et PD-L1 avant traitement, étudiée par TEP-TDM, pouvait être corrélée à la réponse thérapeutique.

L'imagerie TEP de PD-L1 pourrait également servir à étudier durant la thérapie la dynamique de l'expression de PD-L1 au sein de la tumeur, permettant ainsi de s'astreindre de multiples biopsies⁸⁰. La stratégie thérapeutique peut alors être adaptée pour chaque patient grâce à ce suivi longitudinal, en choisissant par exemple l'ajout d'une immunothérapie anti-PD-1/anti-PD-L1 au traitement actuel face à une augmentation de l'expression tumorale de PD-L1. Ainsi, l'immunoTEP appliquée aux anti-PDL-1, mais également PD-1, offre une véritable perspective d'amélioration dans le traitement des patients, avec une médecine personnalisée, et une possible avancée

dans la connaissance des mécanismes tumoraux, d'autant plus que PDL-1 est retrouvé dans différents cancers.

4. L'immunoTEP anti-IL6R et les maladies inflammatoires

De nombreuses thérapies appliquées avec succès chez des patients atteints de maladies rhumatismales inflammatoires ciblent les cytokines pro-inflammatoires, leurs récepteurs, ou leur transduction de signaux. Parmi ces cytokines, l'IL-6 se distingue en raison de sa très forte concentration sérique, et de son rôle central dans l'induction de la réponse en phase aiguë. L'IL-6 avait été à l'origine étudiée comme une cytokine produite par les lymphocytes T, et qui induisait la différenciation des cellules B en cellules de production d'anticorps. Par la suite, il est devenu clair que l'IL-6 était impliquée non seulement dans la régulation du système immunitaire, mais aussi dans la régulation des systèmes hématopoïétiques et métaboliques. (Figure 19) De plus, il a été démontré dans plusieurs maladies inflammatoires chroniques que le taux d'IL-6 était corrélé à l'activité de la maladie, et qu'il jouait un rôle central dans la physiopathologie de l'inflammation chronique, conduisant au développement d'inhibiteurs de l'IL-6 ou de son récepteur. ⁸¹

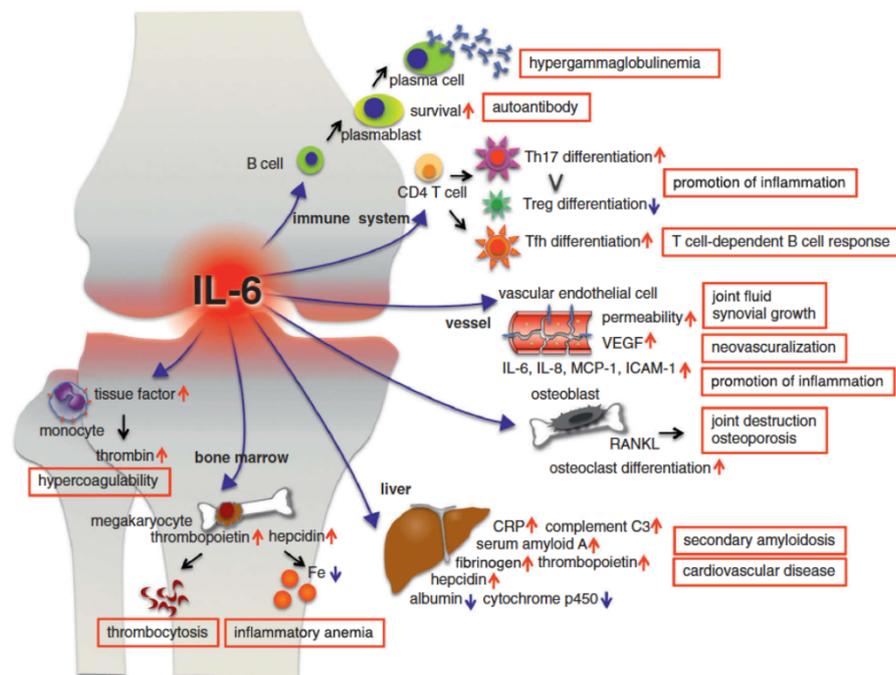


Figure 19 : Rôles de l'interleukine 6 dans la polyarthrite rhumatoïde ⁸¹

Le tocilizumab, a été autorisé il y a plus d'une décennie dans le traitement de la polyarthrite rhumatoïde (PR), de l'arthrite juvénile idiopathique systémique et polyarticulaire, du CRS et plus récemment du COVID-19. Le sarilumab, un anticorps humain contre l'IL-6R α , a récemment été approuvé pour la PR, élargissant les options pour inhiber spécifiquement l'inflammation médiée par l'IL-6. Il est intéressant de noter que les Ac monoclonaux anti-IL-6R empêchent la liaison de l'IL-6 à ses récepteurs solubles et de surface cellulaire, entraînant une augmentation des niveaux circulants d'IL-6 sans conduire à des réponses inflammatoires.⁸² Néanmoins, une variabilité de l'efficacité des traitements anti-IL-6R est observée. En effet, entre 50 et 60% des patients répondent au tocilizumab.⁸³ Outre la variation de la quantité d'IL6, cette variabilité pourrait être liée à une différence d'expression de l'IL-6R selon les patients.⁸⁴ À ce jour, il n'existe aucun outil pour évaluer l'expression du récepteur IL-6 *in vivo*, ni d'outil pour prédire la réponse au traitement des patients et/ou la toxicité.

Dans la littérature, les articles portant sur le radiomarquage d'Ac anti-récepteurs à l'interleukine 6 (IL-6R) sont peu nombreux.

En 2017, l'équipe de Camacho s'est intéressée au radiomarquage du tocilizumab au ^{99m}Tc appliqué à des modèles murins (BALB/c) de myélome multiple. Cette première étude a montré la faisabilité du radiomarquage au ^{99m}Tc de cet Ac, ainsi qu'une absorption hépatique et tumorale élevée 24 heures après l'injection. Une seconde étude, menée en 2021, par cette même équipe, a confirmé les résultats avec une clairance sanguine rapide de l'Ac, et une fixation significative au niveau des tumeurs greffées et du MM.^{85,86} Une troisième étude porte sur l'évaluation d'un Ac anti-IL6R marqué au ^{99m}Tc chez des souris transplantées avec des cellules synoviales provenant d'un patient atteint de PR. (Figure 20)

Les résultats ont montré que les Ac s'accumulaient dans le tissu implanté. Les Ac anti-récepteurs de l'IL-6 radiomarqués ont permis de montrer une distribution des récepteurs de l'IL-6 corrélée à une infiltration de cellules inflammatoires au stade précoce de la PR.⁸⁷

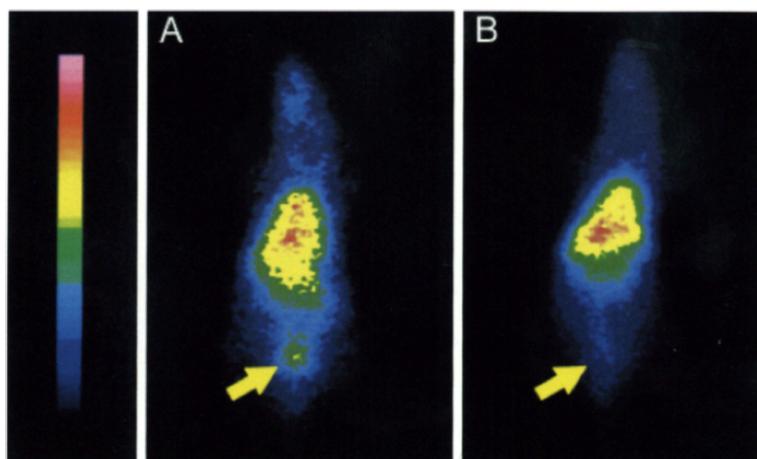


Figure 20 : fixation de l'Ac anti-IL6R radiomarqué au ^{99m}Tc (A) et de l'Ac irrelevant (B) sur les tissus synoviaux humains implantés⁸⁷. Flèches jaunes : tissu implanté

L'immunoTEP anti-IL-6R dans le cadre de la PR est prometteur. En effet, des études ont démontré que la phase précoce de la maladie est caractérisée par des changements cellulaires et moléculaires précédant les altérations anatomiques. L'immunoTEP pourrait ainsi permettre la détection de changements physiopathologiques précoces avant l'apparition de lésions anatomiques dans la PR. De plus, à l'instar de PD-L1, le suivi longitudinal à l'aide de l'immunoTEP pourrait permettre d'adapter le traitement ou d'y associer des molécules. Le tacrolimus pourrait, par exemple, permettre de potentialiser l'effet du tocilizumab.^{81,88}

Outre la polyarthrite rhumatoïde, le radiomarquage du tocilizumab pourrait être utilisé dans d'autres maladies inflammatoires dans lesquelles l'IL-6 joue un rôle, comme la maladie de Horton.

Chapitre 3 : Radiomarquage d'anticorps dans l'ImmunoTEP

Les radionucléides émetteurs β^+ utilisés en recherche et en clinique peuvent être classés en 2 grandes catégories : les radiohalogènes (fluor-18, iode-124...) et les radiométaux (zirconium-89, gallium-68, cuivre-64...) (Figure 21).

En immunoTEP, les vecteurs étant des Ac, ils sont caractérisés par un poids moléculaire élevé, en particulier lorsqu'ils sont entiers. Ils permettent ainsi un marquage par la chélation de radiométaux, sans pour autant entraîner une modification significative de la structure de l'Ac. De plus, plusieurs métaux présentent des périodes relativement longues (plusieurs dizaines d'heures) adaptées à la cinétique des Ac et fragments d'Ac. Dans le cadre de cette thèse, nous nous concentrerons donc sur les radiométaux et les techniques de radiomarquage associées.

CLASSIFICATION PERIODIQUE DES ELEMENTS

- Métaux
- Semi-conducteurs
- Non-métaux
- Gaz nobles
- Lanthanides et actinides
- Hallogène

- Li** :Solide à 25°C, sous 1 bar
- He** :Gaz à 25°C, sous 1 bar
- Br** :Liquide à 25°C, sous 1 bar
- Tc** :Obtenu par synthèse

I																		VIII									
1																		2									
1	H																		2	He							
2	Li	Be																	10	Ne							
3	Na	Mg																	18	Ar							
4	K	Ca	Sc	Ti	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Ga	Ge	As	Se	Br	Kr									
5	Rb	Sr	Y	Zr	Nb	Mo	Tc	Ru	Rh	Pd	Ag	Cd	In	Sn	Sb	Te	I	Xe									
6	Cs	Ba	Lu	Hf	Ta	W	Re	Os	Ir	Pt	Au	Hg	Tl	Pb	Bi	Po	At	Rn									
7	Fr	Ra	Lw	Rf	Db	Sg	Bh	Hs	Mt	Uun	Uuu	Uub															
			Série des Lanthanides																								
			La	Ce	Pr	Nd	Pm	Sm	Eu	Gd	Tb	Dy	Ho	Er	Tm	Yb											
			Ac	Th	Pa	U	Np	Pu	Am	Cm	Bk	Cf	Es	Fm	Md	No											
			Série des Actinides																								

Figure 21 : Classification périodique des éléments

I. Méthode directe ou méthode indirecte de radiomarquage

1. Méthode directe

Le radiomarquage direct est une méthode qui concerne généralement le marquage des protéines, au niveau de la chaîne latérale de leurs acides aminés. En 1997, Goldenberg *et al.* ont montré qu'il était possible de radiomarquer un anticorps, l'arcitumomab, au ^{99m}Tc , sans avoir à modifier la structure du vecteur. Il existe également une seconde méthode passant par la réduction des ponts disulfures en groupements thiol par le 2-mercaptoéthanol. Le radiomarquage des Ac par voie directe nécessite une densité suffisante en groupement thiol afin d'obtenir un complexe stable. De plus, la stabilité du complexe obtenu représente la faiblesse majeure du marquage direct. Afin de s'affranchir de ces limites, une des alternatives consiste à réaliser un marquage "indirect" avec un groupement prosthétique. (Figure 22)

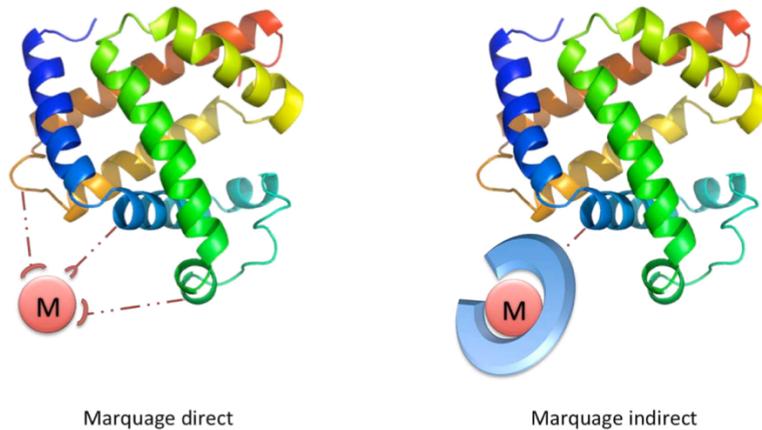


Figure 22 : Marquage direct et indirect de protéines par des radiométaux ⁸⁹

2. Méthode indirecte

Le marquage indirect des Ac par des radiométaux nécessite des molécules appelées agents chélatants bifonctionnels, qui sont composées d'une part, d'un ligand permettant la coordination du métal, et d'autre part, d'un groupement fonctionnel permettant une liaison covalente avec le vecteur. (Figure 23)

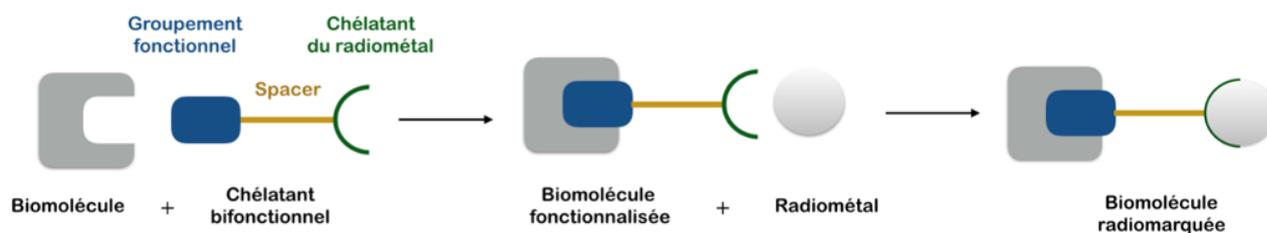


Figure 23: Radiomarquage d'une biomolécule fonctionnalisée par un chélatant bifonctionnel par méthode indirecte

Entre ces deux parties il est possible de trouver un spacer, composé d'une chaîne hydrocarbonée ou peptidique, afin de diminuer les possibles interactions entre le chélatant et le vecteur avec le radiométal, et de modifier, si nécessaire, les propriétés pharmacocinétiques du complexe.

Ils existent plusieurs types de chélatants, et deux familles principales se distinguent. Premièrement, les ligands acycliques polyazotés tels que le DTPA, l'EDTA ou le DFO, connu pour être le ligand du ^{89}Zr , permettent d'obtenir un rendement et une pureté radiochimique élevés. Cependant, la faible stabilité du complexe *in vivo* peut conduire à des problèmes de transmétallation/transchélation.

La seconde famille de chélatant est celle des macrocycliques. Les propriétés complexantes de ces ligands ont largement été décrites dans la littérature. Les principaux chélatants de cette famille sont les tétraazacycloalcanes, tel que le DOTA, très utilisé pour la chélation du ^{64}Cu . De multiples études ont montré que les chélatants macrocycliques permettent d'observer une stabilité *in vivo* supérieure à celle obtenue avec les chélatants linéaires. ⁹⁰

Le marquage indirect de l'Ac nécessite de respecter différents points :

- Les conditions de conjugaison doivent respecter la structure tertiaire et quaternaire de l'Ac, par exemple, la température réactionnelle ne doit pas excéder les 40°C afin de ne pas dénaturer l'Ac
- La liaison covalente entre le chélateur et la protéine doit être stable *in vivo*. Le ratio molaire chélatant/Ac doit respecter l'affinité de liaison, et la spécificité de la protéine. Dans ces réactions de conjugaison conventionnelles, la présence de multiples acides aminés accessibles aux chélatants sur les protéines peut

entraîner un encombrement stœchiométrique, et secondairement une diminution d'affinité et d'immunoréactivité vis-à-vis de l'Ag.⁹¹

- Le complexe doit présenter une stabilité thermodynamique et une inertie cinétique suffisante pour résister aux possibles transchélations et transmétallations *in vivo*.

II. Méthodes de fonctionnalisation de l'anticorps

1. Fonctionnalisation non site spécifique

La conjugaison s'effectue principalement sur des groupes azotes ou amines par une liaison covalente sur le vecteur pour permettre le radiomarquage ultérieur de la molécule. Elle est très avantageuse car les amines sont très abondantes au niveau de la surface d'un Ac. Différentes fonctions peuvent réagir avec les amines, les plus utilisées sont les esters de N-hydroxysuccinimide (NHS) et les isothiocyanates (NCS) (Figure 24).⁹²

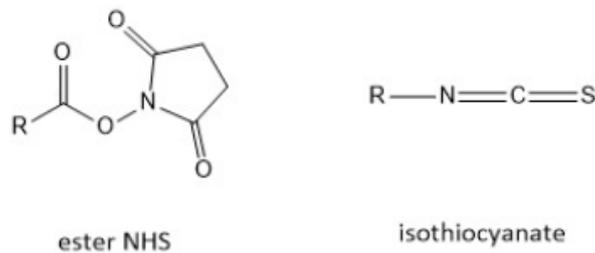


Figure 24 : Représentation des fonctions ester NHS et isothiocyanate

Il est possible de diminuer les risques de perte d'immunoréactivité par l'addition d'une polylysine en C-terminale, permettant ainsi de favoriser la conjugaison sur les lysines en C-terminal (Figure 25).⁹³

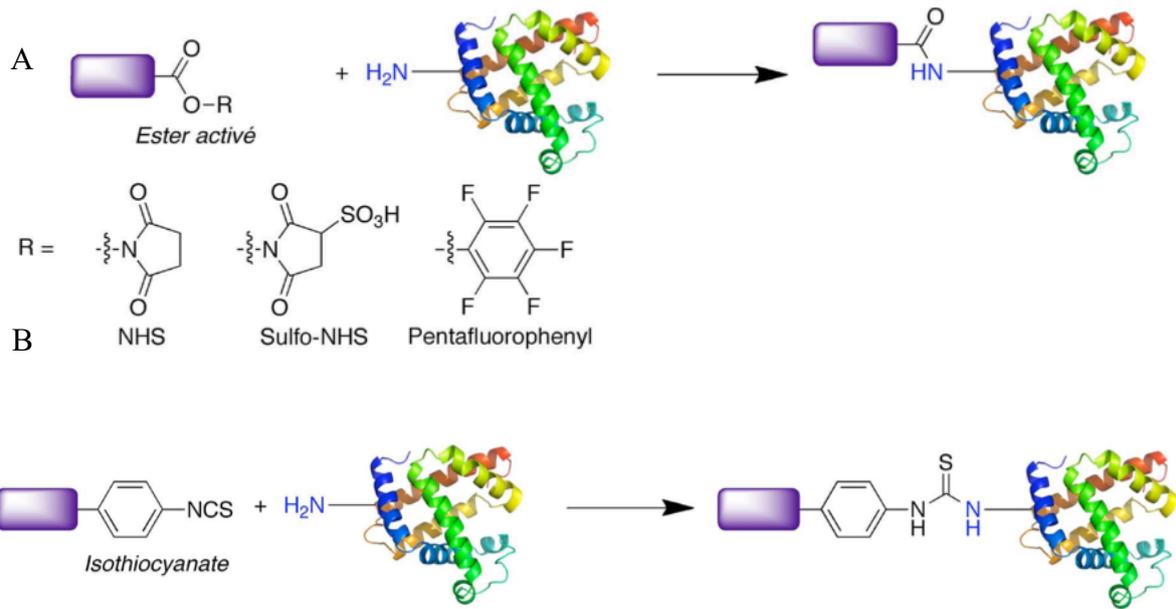


Figure 25 : Fonctionnalisation par les fonctions ester NHS (A) et isothiocyanate (B)⁸⁹

Une seconde méthode, moins courante, est la conjugaison via une cystéine, mais elle est plus rare dans la nature. Cette méthode se concentre sur les groupements sulfhydriles (-SH) ou thiols, présents au niveau des cystéines des ponts disulfures des Ac.⁹⁴ Soit les ponts disulfures sont réduits afin de générer des thiols réactifs à la conjugaison, soit des groupements thiols sont introduits au niveau d'amines primaires. Les fonctions capables de se lier aux thiols sont généralement les maléimides et les haloacétyles (Figure 26).

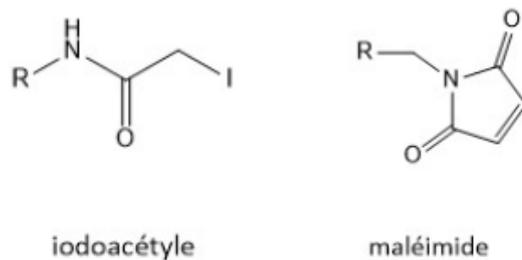


Figure 26 : Représentation des fonctions ester iodoactéyle et maléimide

Cependant, la modification des Ac suivant ces méthodes peut compromettre les profils d'immunoréactivité et de distribution des Ac radiomarqués. Par conséquent, des efforts importants ont été consacrés au développement de stratégies de conjugaison spécifiques au site afin de produire des radiotraceurs bien définis pour une imagerie de haute qualité.

2. Fonctionnalisation spécifique au site ⁹⁵

Des stratégies efficaces de bioconjugaison spécifique au site ont été développées en utilisant différentes méthodes afin d'atteindre une chimiosélectivité. Comme décrit dans la littérature, de nombreuses conjugaisons d'anticorps spécifiques au site ont été développées telles que :

- **L'ingénierie Cys** : La conjugaison par la cystéine permet de fixer un groupement cystéine-maléimide de manière réversible, de façon relativement simple et directe sans avoir besoin de réactifs ou d'enzymes spécifiques (Figure 27). Bien qu'il y ait une instabilité potentielle *in vivo*, en fonction de l'emplacement du résidu de Cys modifié, c'est une méthode fréquemment utilisée pour le radiomarquage spécifique au site des Ac. De nouvelles méthodes permettent de réaliser une bioconjugaison Cys irréversible.⁸⁴

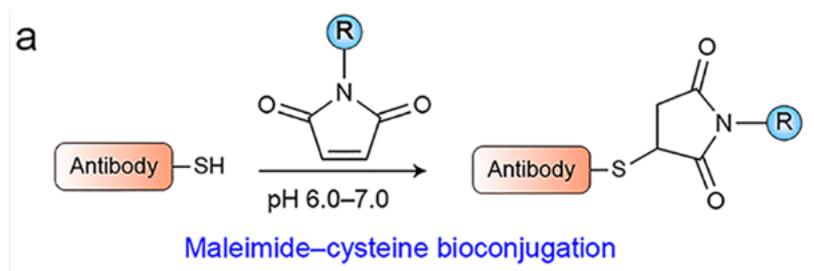


Figure 27 : Bioconjugaison par ingénierie Cys ⁸⁴

- **Méthode enzymatique et chimio-enzymatique** : Les conjugaisons par des méthodes de modification chimio-enzymatique ont été étudiées en utilisant plusieurs techniques : la modification du glycane avec des transformations multi-étapes utilisant l' α -2,6-sialyltransférase, la β -1,4-galactosidase et la β -1,4-galactosyltransférase mutée, et la conjugaison médiée par la sortase-A (Figure 28).

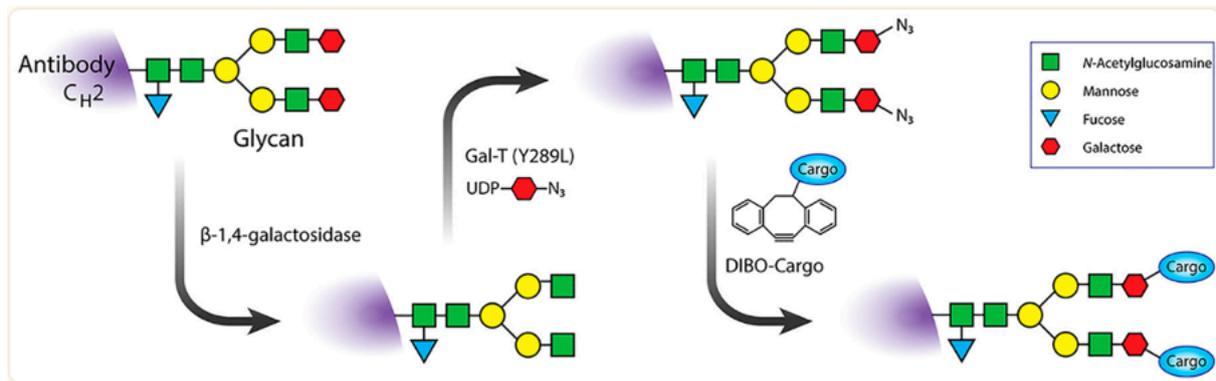


Figure 28 : Bioconjugaison par méthode enzymatique et chimio-enzymatique ⁸⁴

La sortase A est une enzyme dérivée de *Staphylococcus aureus*. En général, la sortase reconnaît les substrats contenant des motifs spécifiques, et clive le peptide entre la thréonine et la glycine formant ainsi de nouvelles liaisons peptidiques avec des substrats nucléophiles. Il est alors facile d'installer des fractions fonctionnelles (par exemple, un chélateur) sur l'extrémité N ou C d'un Ac d'une manière spécifique au site (Figure 29).

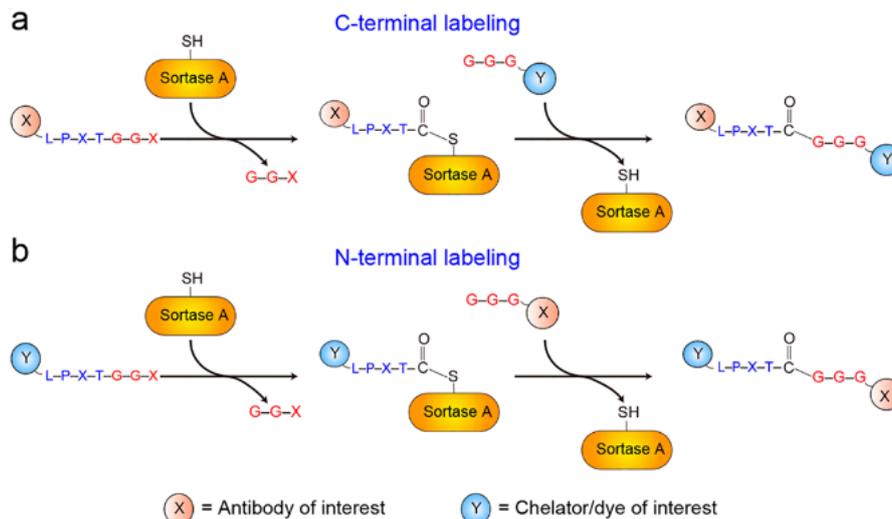


Figure 29 : Bioconjugaison par la sortase A ⁸⁴

Ce type de conjugaison est très souvent réalisée pour la fonctionnalisation des nanobodies, cela permet de diminuer l'impact sur l'affinité et l'immunoréactivité du nanobody. Cette méthode permet de produire des immunoconjugués plus homogènes. Une étude récente a démontré que le ⁸⁹Zr-DFO-trastuzumab développé à l'aide de cette stratégie chimioenzymatique surpassait son homologue développé par la méthode de conjugaison non spécifique parce que le ⁸⁹Zr-DFO-trastuzumab modifié

de manière spécifique au site a montré une immunoréactivité et une stabilité accrue dans les études d'imagerie immunoTEP.⁸⁴

- **Les étiquettes peptidiques** : Afin de réaliser des modifications spécifiques au site, les Ac peuvent être produits avec de courtes étiquettes peptidiques via des protocoles standards d'ingénierie des protéines et d'expression recombinante. Généralement, les étiquettes sont introduites à l'extrémité C-terminale des mAb ou sdAb pour éviter les interférences au niveau du site de liaison. Les modifications par cette technique génèrent des conjugués d'anticorps couplés à des charges utiles à haute sélectivité et stabilité, bien que l'immunogénicité potentielle des balises peptidiques introduites soit actuellement inconnue.

- **Chimie click** : Plus récemment, une approche de fonctionnalisation basée sur la « chimie click » est apparue : ces réactions sont biocompatibles, rapides, stéréospécifiques, et permettent d'obtenir un très bon rendement dans des conditions optimales pour des Ac.⁹⁶ La réaction « chimie click » utilisent des fonctions chimiques qui ne sont pas retrouvées naturellement dans le milieu biologique, permettant ainsi une meilleure spécificité de la réaction de fonctionnalisation. La chimie click a été conçue pour différentes applications :

- Les réactions de radiomarquage avec des groupes prothétiques,
- La création de nouvelles architectures de chélation,
- La bioconjugaison spécifique au site
- Le préciblage *in vivo*.

Parmi les diverses réactions, la cycloaddition catalysée par le Cu(I) entre les azides et les alkynes (CuAAC) est fréquemment utilisée pour développer des produits radiopharmaceutiques. Néanmoins, il est nécessaire d'éviter l'utilisation du catalyseur Cu(I) lors du développement de sondes immunoTEP avec des radiométaux. Ainsi, la chimie bioorthogonale mettant en jeu la cycloaddition azide-alkyne (SPAAC) peut se révéler comme une alternative intéressante (Figure 30). La réaction SPAAC, pour strainpromoted azide-alkyne cycloaddition, met en jeu la cycloaddition des azotures avec des alkynes de type cyclooctyne ou dibenzocyclooctyne (DBCO)⁸⁶. Le DBCO est facilement disponible dans l'industrie et permet ainsi d'éviter une synthèse complexe.

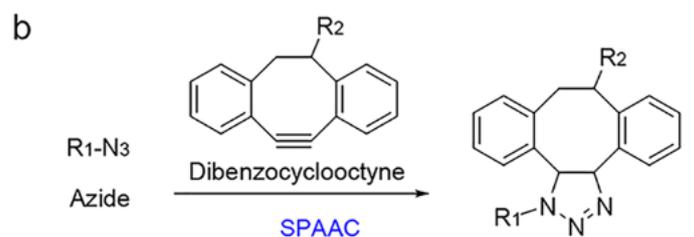


Figure 30 : cycloaddition azide-alkyne (SPAAC) ⁸⁴

Une autre technique connue de la « chimie-click » est le préciblage. Cette approche a été initialement développée avec le système avidine-biotine, qui consiste en l'utilisation d'un immunoconjugué modifié par la streptavitine, et d'une biotine radiomarquée. Puis, il a été développé la cycloaddition Diels-Alder (IEDDA) entre une tétrazine et un alcène (Figure 31). ⁸⁷

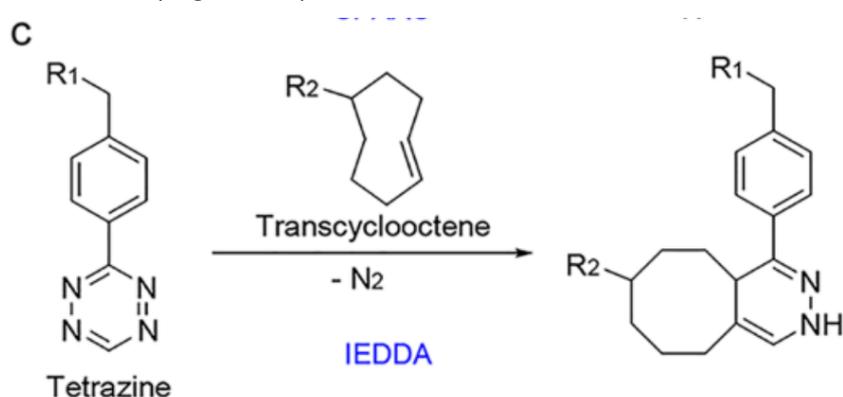


Figure 31 : cycloaddition Diels-Alder (IEDDA) ⁸⁴

Cette technique est caractérisée par une cinétique très rapide, et est généralement utilisée en pré-ciblage par une première injection du vecteur modifié avec l'alcène, permettant son accumulation au niveau de la cible. Puis, l'injection du ligand radiomarqué contenant une tétrazine. En 2011, Zeglis *et al* ont utilisé la cycloaddition Diels-Alder pour la bioconjugaison d'un immunoconjugué modifié, le trastuzumab, avec la desferrioxamine couplée avec une tétrazine afin de radiomarquer au ⁸⁹Zr. Et dans un second temps, avec le DOTA, également couplé avec une tétrazine, pour radiomarquer au ⁶⁴Cu. L'imagerie TEP *in vivo* et les expériences de biodistribution ont révélé une absorption significative et spécifique des bioconjugués.⁸⁸

La description des différentes stratégies de fonctionnalisation n'est pas exhaustive, il existe de multiples possibilités de marquages des Ac. La grande variabilité de chélatants disponibles, mais également de vecteurs, empêche la possibilité d'avoir une méthode de fonctionnalisation de référence.

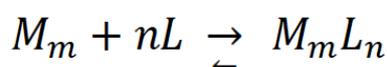
III. Chimie des métaux

1. Notion de complexation

La liaison de coordination est définie par un partage entre deux atomes d'un doublet d'électron qui est apporté uniquement par l'un des deux partenaires. C'est cette liaison qui intervient lors de la complexation des ions métalliques. Ce sont des liaisons toujours polaires (suite à la complexation le partenaire receveur est négatif et le partenaire donneur est positif). Les acides de Lewis sont les atomes présentant une lacune électronique, et ils s'associent à une espèce pouvant partager ses doublets d'électrons : les bases de Lewis, qui sont en général représentées par les éléments les plus électronégatifs de la classification (oxygène, azote, soufre, phosphore, halogénures...), ou des groupements d'atomes électronégatifs.

Les acides de Lewis comprennent tous les cations métalliques (Fe, Ga, Cu...).

Un complexe est défini par une structure polyatomique, appelé ligand L, encadrant un ion métallique M coordinateur. Ce complexe met en jeu n liaisons de coordination formées entre le métal M et le ligand L.



On peut distinguer deux groupes de complexes :

- Les complexes simples : chaque coordinat est lié à l'ion central par une unique liaison de coordination.
- Les complexes internes (ou chélate) : le coordinat est lié au métal par plusieurs liaisons de coordination.

2. Stabilité des complexes

Les complexes sont des situations d'équilibre chimique, c'est-à-dire que cette association peut être réversible.

Nous pouvons écrire la constante d'équilibre de formation du complexe ML_n :

$K_n = [ML_n] / ([ML_{n-1}] [L])$. Ils existent également des constantes partielles de formation $K_1, K_2 \dots K_n$ qui représentent la stabilité intermédiaire.

La formation du complexe peut être illustrée par l'équation de formation : $\beta = \frac{[ML_n]}{[M][L]^n}$, avec β_n appelée constante globale de formation.

Elle est liée à K_n par : $\beta_n = K_1 \times K_2 \times K_3 \times \dots \times K_n$

Nous pouvons écrire les processus inverses qui sont les réactions de dissociation de ces complexes : $K_{\text{form}} = 1 / K_{\text{diss}}$

Dans l'application radiopharmaceutique, nous nous trouvons dans des conditions de dilution importantes (l'organisme), la stabilité du complexe est donc une recherche importante dans le développement de radiomarquage. Différents facteurs influent sur la stabilité :

- **Le facteur thermodynamique**

Elle représente la force de l'association acide/base de Lewis. Elle est dite thermodynamique, car elle ne dépend que de la température, et caractérise l'équilibre du système.

- **Le facteur cinétique**

Un complexe peut être peu stable d'un point de vue thermodynamique, mais une fois formé la réaction de décomplexation peut être lente. L'inertie cinétique est proportionnelle à l'énergie nécessaire à fournir afin de dissocier le complexe. Elle peut donc être associée à la résistance de rester sous forme liée du cation métallique.

- **La labilité**

Elle définit la vitesse de complexation-décomplexation. Elle est caractérisée par la vitesse à laquelle s'échangent les molécules d'eau dans les complexes.

Par exemple : $(^{64}\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6)_2^+ + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow (^{64}\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_5(\text{H}_2\text{O}))_2^+ + \text{H}_2\text{O}$

La labilité est également liée à la théorie dite HSAB ou le concept de Pearson qui permet de prédire qualitativement l'adéquation entre l'atome donneur et accepteur.

Elle définit un acide de Lewis dur comme un élément faiblement électronégatif, présentant une densité de charge positive élevée et fortement polarisant, comme par exemple, le Ga^{3+} . Plus le degré d'oxydation est grand, plus l'acide est dur.

A l'inverse, un acide mou présente une électronégativité élevée, une charge faible et une grande taille. Plus le degré d'oxydation est bas, plus l'acide est mou.

Dans la définition de Pearson, les cations métalliques sont tous durs.

Les bases de Lewis dures sont caractérisées par une très forte électronégativité, une densité de charges négative élevée, et une capacité fortement polarisante. La dureté augmente avec la charge négative. A l'opposé, une base molle est faiblement électronégative, faiblement polarisante, et avec une densité de charge faible.

Ainsi, l'association d'un acide dur avec une base dure ou d'un acide mou avec une base molle, permet d'obtenir un complexe plus stable. Les ligands doivent être adaptés à la dureté du métal, c'est pour cela qu'il n'existe pas de ligand universel.

- **La contamination par les métaux de l'environnement**

La présence de cations, et donc de métaux, peut influencer le rendement et la cinétique de réaction de complexation. Ainsi, il est important de réaliser les marquages avec du matériel et des solvants permettant de minimiser la possible compétition par des métaux (Fe^{3+} , Zn^{2+} ...).

- **La denticité du ligand**

La denticité est définie par la capacité d'un ligand à complexer un atome central, par l'intermédiaire d'un nombre de liaison distinct. Elle influe sur la stabilité du complexe métallique. Par exemple pour la complexation du cuivre Cu^{2+} , il est recommandé de privilégier le NOTA par rapport au DOTA, car la cage moléculaire complexante est plus petite et ainsi plus adaptée à la taille de l'ion.

- **Le pH**

Les acides carboxyliques sont plus complexants dans des conditions de neutralité, voir basiques. Or lorsque le pH augmente, les cations métalliques vont former des hydroxo-

complexes avec expulsion d'un proton, entraînant une diminution de la solubilité des espèces cationiques.

Pour surmonter cette difficulté, on peut utiliser des tampons type tampon d'ammonium, néanmoins ceux-ci sont légèrement complexants, ils ralentissent alors la cinétique de marquage. Ils sont cependant indispensables afin d'éviter la précipitation des cation métalliques.

Pour obtenir un complexe le plus stable possible, il est utile de travailler à un pH supérieur au minimum d'une unité par rapport au pKa du chélatant.

- **La température**

L'influence de la température sur la cinétique de complexation peut être illustrée par le DOTA. La réaction de complexation est séquentielle, au vu de ses 4 cycles azotés et de ses 4 bras carboxylates, elle nécessite donc de multiples étapes afin d'arriver au complexe le plus stable. Ceci explique la lenteur de la réaction et la nécessité de chauffer lors de la complexation. Le chauffage est plus souvent nécessaire avec les ligands cycliques qu'avec les chélatants acycliques.

Pour résumer, il est possible d'accélérer la complexation en chauffant le milieu réactionnel. Néanmoins, à l'instar du pH, il est important de prendre en compte la nature du vecteur, qui peut être sensible à des conditions réactionnelles trop sévères.

3. Influence des paramètres des radiométaux sur la stabilité du complexe *in vivo*

La stabilité *in vivo* est une difficulté retrouvée dans la chimie de complexation. Le chélatant doit réussir à maintenir ses cations métalliques face à protéines affines pour ces derniers et qui sont présentes dans l'organisme.

- **Résistance à la transchélation**

La transchélation est définie par le déplacement du radiométal de son complexe vers un ligand compétiteur. Un radiométal fréquemment transchélaté *in vivo* est le ^{64}Cu : les cuproprotéines (telles que la céruléoplasmine et les métallothionéines), spécifiques du cuivre, sont très compétitrices et extrêmement présentes dans l'organisme et plus particulièrement au niveau hépatique.⁹⁷ Suite à la chélation par ses protéines, le

^{64}Cu entre dans un cycle entérohépatique, ce qui entraîne son accumulation au niveau du foie, diminuant alors la qualité de l'image, ainsi qu'une irradiation non souhaitée pour le patient.

Un autre exemple qui va nous intéresser pour la suite de la thèse est le cas du ^{89}Zr , complexé au DFO, il peut être transchélaté *in vivo* et se retrouver au niveau des os.⁹⁸ Ceci s'explique par la forme cationique du zirconium, plus précisément, sa dureté qui réagit préférentiellement avec des bases de Lewis dures comme l'azote ou l'oxygène. *In vivo*, le complexe ^{89}Zr -DFO est déstabilisé par deux molécules d'eau endogènes, et ceci pourrait expliquer l'accumulation du zirconium dans le tissu osseux. De plus, en raison d'une forte affinité pour le phosphate, le ^{89}Zr est incorporé à l'hydroxyapatite, et en particulier dans les épiphyses où se produit une formation osseuse plus active.⁹⁹ Pour conclure, la résistance à la transchélation est déterminée par l'inertie cinétique du complexe, et dans une moindre mesure par la stabilité thermodynamique.¹⁰⁰

- **Résistance à la réduction**

Dans l'organisme, de multiples enzymes peuvent conduire à une réduction du radiométal au sein du complexe, entraînant une déstabilisation de ce dernier et un possible relargage du radiométal. Au sujet des radiométaux que nous traiterons par la suite, des enzymes peuvent conduire à la réduction *in vivo* du $^{64}\text{Cu(II)}$ en $^{64}\text{Cu(I)}$, ce qui entraîne le relargage du cuivre du complexe car le ligand ne peut retenir le cuivre que sous forme Cu(II) .¹⁰¹ Il est nécessaire que le complexe possède un faible potentiel d'oxydoréduction afin de résister à la réduction dans l'organisme.

Quant au $^{89}\text{Zr(IV)}$, il peut être hypothétiquement réduit en Zr(III) , néanmoins, cette réaction n'est possible qu'à un potentiel d'oxydo-réduction plus bas que celui des couples oxydoréducteurs ou des protéines (typiquement la ferrédoxine) que l'on peut retrouver dans l'organisme.

- **Résistance à la transmétallation**

La transmétallation est définie par le remplacement au sein du ligand du métal chélaté par un autre. Nous avons déjà évoqué ce phénomène qui peut être observé *in vitro* lors de la complexation ou du radiomarquage à cause de la contamination par d'autres métaux présents dans le milieu réactionnel.

In vivo, le remplacement du cuivre met en jeu le plus souvent le Zn^{2+} et le Fe^{3+} , qui sont naturellement présents dans l'organisme. Cette dissociation est irréversible, en effet, une fois substitué, le cuivre libre est capté par les cuproprotéines. Pour résister à la transmétallation, le chélatant doit avoir une grande spécificité pour le radiométal, ainsi qu'une inertie cinétique importante.

IV. Le Zirconium 89 et le Cuivre 64 en immunoTEP

Parmi les métaux utilisés en TEP, le Cuivre 64 (^{64}Cu) et le Zirconium 89 (^{89}Zr) sont particulièrement intéressants pour le radiomarquage des Ac compte tenu de leur période de plusieurs heures, adaptée à la cinétique lente des Ac.^{102,103} Nous allons donc par la suite nous concentrer sur ces 2 radionucléides.

Le tableau 2 reprend les principales caractéristiques de ces 2 radionucléides.

	^{89}Zr	^{64}Cu
Période	78.4h	12.7h
Emission	β^+ (23%) EC (77%) E _{max} β^+ 897 keV Émission γ 909 keV	β^+ (19%) / β^- (40%) EC (41%) E _{max} β^+ 656 keV Émission γ 1346 keV
Biodistribution	Affinité du Zr^{4+} pour les os (épiphyse) en <u>préclinique</u> Transchélation <i>in vivo</i>	Affinité du cuivre pour le foie Transchélation <i>in vivo</i>
Radiochimie	Rendement de marquage élevé avec les macromolécules Production selon les BPF Risque de contamination métallique Rayonnement gamma associé de haute énergie	Faible énergie B + Rendement de marquage élevé avec les macromolécules Faible coût de production Moins de 1% de rayonnement gamma associé Emission B- associée pour la thérapie ?

Tableau 3 : Comparaison du Zirconium 89 et du Cuivre 64. EC : capture électronique ; E_{max} : énergie maximale

Le ^{89}Zr est adapté pour une étude de preuve de concept, en effet sa période (78,4h) permet d'étudier l'Ac sur une cinétique plus longue. Dans des études plus avancées impliquant une injection à l'homme, l'utilisation du ^{64}Cu est plus pertinente afin d'optimiser la radioprotection des patients grâce à sa période qui reste plus intermédiaire.

1. Le Zirconium 89

- Physique

Parmi différents isotopes du zirconium, c'est le ^{89}Zr qui a le plus capté l'attention pour développer des médicaments radiopharmaceutiques, en raison de ses caractéristiques de désintégration nucléaire favorables qui le rendent utile dans le marquage des Ac pour les applications immuno-PET.

Le ^{89}Zr est caractérisé par un déficit en neutrons avec 49 neutrons et 40 protons et par une période physique de 78,4h. Son schéma de désintégration se répartit entre la capture électronique (77 %) et l'émission de positons (23 %) (Figure 32).

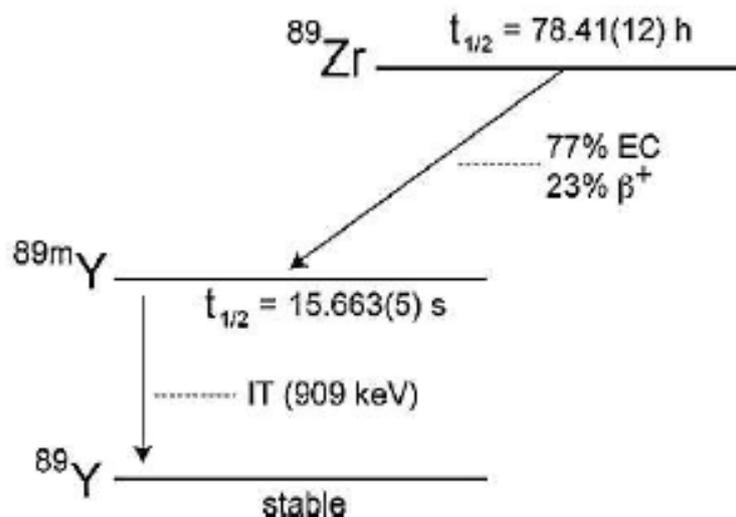


Figure 32 : Schéma de désintégration du ^{89}Zr

Les deux voies de désintégration mènent à la formation de ^{89}Y métastable qui se désexcite avec l'émission d'un rayon gamma de 909 keV. Le ^{89}Zr émet deux types de rayonnements importants : les rayonnements de 511keV consécutifs à l'annihilation

du positon, d'énergie maximale de 890 keV avec une moyenne de 390 keV, et les rayonnements de 909keV de désexcitation du ^{99m}Y .

Le ^{89}Zr est produit par un cyclotron selon les réactions $^{89}\text{Y}(p,n)^{89}\text{Zr}$ et $^{89}\text{Y}(d,2n)^{89}\text{Zr}$. Le ^{89}Zr peut être obtenu par bombardement de protons sur ^{89}Y , l'abondance isotopique de la cible est de 100 %, ce qui permet d'avoir une production moins coûteuse. Il a été montré que l'énergie la plus favorable des protons pour le bombardement de la cible d'yttrium est de 14 MeV¹⁰⁴, mais au-delà de 13MeV une impureté isotopique est produite, le ^{88}Zr , de période de 83,4 jours dont l'isotope fils est l' ^{88}Y de demi vie de 106 jours, ce qui peut représenter un problème en terme de gestion de la dosimétrie et des déchets.

La seconde réaction possible pour obtenir du ^{89}Zr est l'utilisation d'un faisceau de deutéron, d'énergie minimale de 5,6 MeV sur une cible d' ^{89}Y . Cette méthode permet de limiter la contamination par le ^{88}Zr , car l'énergie seuil pour obtenir ce radioisotope est de 15,5MeV.¹⁰⁵

- Chimie¹⁰⁶

Le zirconium fait partie de la famille des métaux de transition. Ils existent différents états d'oxydation du zirconium, Zr(II), Zr(III) et Zr(IV) mais il est généralement retrouvé sous forme d'ion +4 en solution aqueuse.¹⁰² Il est généralement disponible en solution soit sous forme d'oxalate de zirconium-89 ($^{89}\text{Zr}(\text{ox})_2$), soit sous forme de chlorure de zirconium-89 ($^{89}\text{ZrCl}_4$), influençant ainsi la chimie pour le développement d'agents immuno-PET efficaces.

Le cation Zr(+IV) est un ion caractérisé par une charge élevée, formant ainsi des complexes avec un nombre de liaisons de coordination élevé (jusqu'à 8 liaisons), préférentiellement avec des donneurs d'oxygène anionique (car le zirconium est un cation dur). C'est-à-dire que le Zr(+IV) nécessite un ligand polydentate avec 6 à 8 atomes donneurs.

Actuellement, des résultats expérimentaux montrent qu'en raison de sa charge élevée et de son petit rayon, le Zr(IV+) existe en tant qu'espèce monomère et polynucléaire en solution aqueuse à faible pH. En effet, la forte densité de charge sur l'ion Zr^{4+}

favorise la déprotonation des molécules H₂O pour donner de l'hydroxyde coordonné qui agit comme un ligand. Cependant, lorsque les solutions du tétramère sont acidifiées, des espèces monomériques de Zr⁴⁺ sont formées par protonation des groupes hydroxo pontants. La nature et l'abondance de ces espèces peuvent changer en fonction du pH, par exemple, un pH croissant favorise la formation et la précipitation des espèces d'hydroxyde de zirconium. Cela rend plus difficile la détermination précise des constantes de stabilité avec les chélatants.¹⁰⁷

- Métabolisme du zirconium

Le comportement du Zr⁴⁺ libre dans les systèmes biologiques a été étudié afin d'évaluer la sécurité de l'utilisation de ⁸⁹Zr comme traceur PET ainsi que pour mieux comprendre le devenir du MRP dans l'organisme. Ceci est particulièrement important pour le zirconium en raison de sa forte affinité pour l'os.¹⁰⁷

A l'état basal, l'organisme contient des petites quantités de zirconium que l'on retrouve dans la graisse, le foie, la vésicule biliaire, ainsi que des traces dans le cerveau. L'excrétion du zirconium exogène, apporté par l'alimentation, implique le système hépatobiliaire et entraîne une élimination fécale plutôt qu'urinaire.

Il existe encore des questions quant au devenir du zirconium au sein de l'organisme. En effet, une étude a révélé que le chlorure de Zr s'accumule dans le foie, ce qui suggère qu'il se présente sous forme colloïdale, tandis qu'une autre étude utilisant une méthode de préparation différente du chlorure de Zr, n'a montré aucune accumulation dans les tissus mous. Le Zr-DFO est éliminé très rapidement par les reins et peut être excrété par l'urine en quelques minutes.¹⁰⁶

Le zirconium a une forte affinité pour l'os, et donc lorsqu'il n'est pas étroitement lié à un chélate ou qu'il est transchélaté, il s'accumule de préférence dans ce tissu, ce qui a été observé chez des rats et des souris. Il est particulièrement important de prendre en compte ce comportement en clinique, car son accumulation dans l'os peut être problématique en pratique.

De plus, une comparaison de l'absorption osseuse provenant de différentes espèces de zirconium démontre que l'absorption osseuse est plus élevée lors de l'injection de chlorure de Zr, suivie de Zr-oxalate, puis de Zr-citrate, et enfin de Zr-DFO avec une

absorption osseuse significativement moins importante. Il convient de noter que les premiers essais cliniques avec ^{89}Zr ne démontrent pas l'étendue de l'absorption osseuse exposée dans les images précliniques.⁹⁹

- Chélation du Zirconium 89

Pour permettre le radiomarquage par le ^{89}Zr à des protéines, dont les Ac, nous développerons ici certains chélatants pouvant être utiles pour la chélation du ^{89}Zr .

- **Les chélatants non hydroxamates**

Lors des premières études sur le ^{89}Zr en imagerie TEP, des chélateurs métalliques communs, comme l'acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA) ou l'acide diéthylènetriaminepentaacétique (DTPA) ont été utilisés (Figure 33). Le DTPA est capable de saturer la sphère de coordination du zirconium et atteint donc une plus grande stabilité thermodynamique.

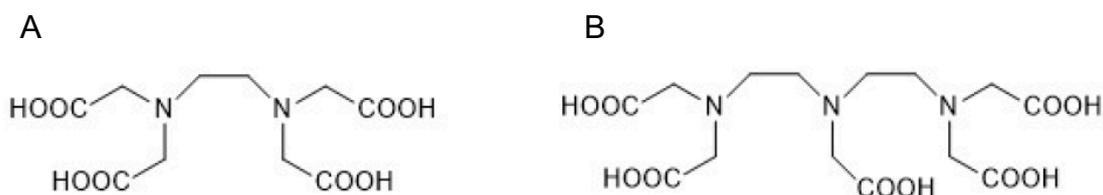


Figure 33 : Représentation de chélatant non hydroxamate : EDTA (A) et DTPA (B)

Parmi les ligands non hydroxamates, il est important d'évoquer les ligands macrocycliques. En imagerie TEP, le chélatant DOTA est considéré comme un gold standard pour le ^{64}Cu et le ^{68}Ga . Il est caractérisé par 4 oxygènes et des groupements acétates qui jouent le rôle de donneurs d'électrons forts, ce qui n'est pas pertinent pour la chélation du Zr(IV) . Néanmoins, Pandya *et al.* ont montré que les tétraazamacrocycles tels que DOTA, et ses dérivés (DOTAM, DOTP) sont capables de former des complexes très stables avec le ^{89}Zr .¹⁰⁷ Les premières tentatives avec le ^{89}Zr sous forme oxalate ont échoué, mais l'utilisation de la forme chlorure ou acétylacétonate du ^{89}Zr a été un succès. Cependant, l'utilisation de ces chélatants nécessite de travailler avec une température élevée (90°C) pour la radiomarquage, ce qui rend impossible leur application à un Ac. Dans un article récent, le même groupe a évalué les petits chélatants macrocycliques, tels que NOTA, TRITA et PCTA pour

surmonter l'obstacle de la température élevée. En effet, la NOTA et la PCTA pouvaient être radiomarquées dans des conditions douces (37°C), et les chélatants radiomarqués au chlorure de zirconium présentaient de bonnes caractéristiques *in vitro* et *in vivo*.¹⁰⁸

- **Chélatants hydroxamates : la desferrioxamine et ses dérivés**

La Desferrioxamine (DFO ou Df) est un chélateur utilisé en clinique pour la complexation du ⁸⁹Zr. Généralement, la préparation de conjugués ⁸⁹Zr-Ac implique une synthèse en plusieurs étapes, dans laquelle un dérivé succinylé de la desferrioxamine B (N-sucDf) a été utilisé pour conjuguer les Ac. Cette méthode a donné de bons résultats : une conjugaison optimisée avec une pureté radiochimique élevée, une conservation de l'immunoréactivité et de la stabilité de l'anticorps.¹⁰⁹

Le développement d'un nouveau dérivé p-isothiocyanatobenzyle de la desferrioxamine B (connue sous le nom de p -SCN-Bn-desferrioxamine, Df-Bz-NCS) a permis une préparation plus simple et rapide de conjugaison des Ac. Ce processus implique le premier couplage de Df-Bz-NCS aux groupes lysine-NH₂ d'un Ac dans des conditions alcalines (pH 8,9–9,1) suivi d'un radiomarquage avec ⁸⁹Zr sous forme oxalate. (Figure 34)

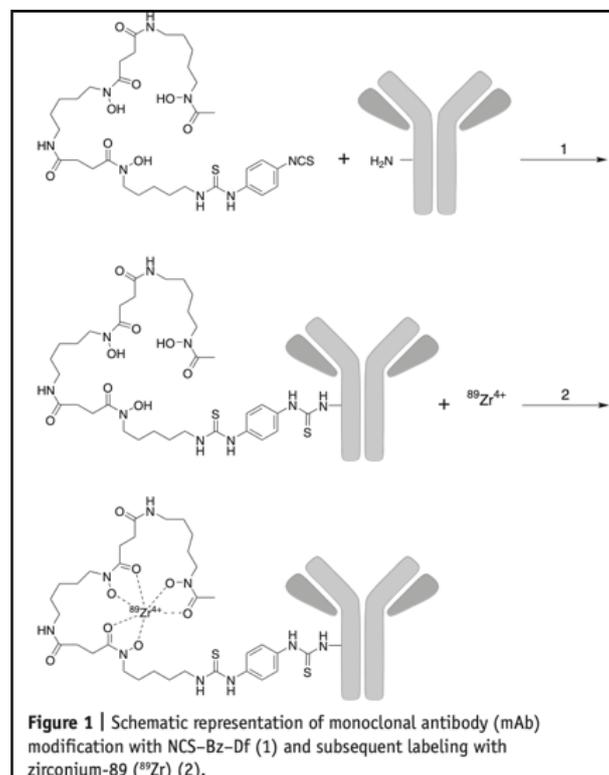


Figure 34 : Fonctionnalisation avec NCS-Bz-Df et radiomarquage au ⁸⁹Zr d'un Ac monoclonal¹¹⁰

Le chélateur hydroxamate desferrioxamine (DFO) est hexadenté, et il présente des propriétés chélatrices pour le zirconium supérieures à celles des chélatants non hydroxamates, tel que le DTPA. L'explication la plus probable se trouve dans le concept de Pearson (HSAB). La DTPA coordonne via trois atomes d'azote et cinq atomes d'oxygène, tandis que le DFO offre six donneurs d'oxygène, 3 anioniques et 3 neutres.

A partir de ce ligand, un second dérivé a été synthétisé, le DFO* qui se distingue par l'incorporation d'une fonction hydroxylamine par réaction de couplage entre le sel de Desferrioxamine et une fonction carboxylate¹¹¹ (Figure 35). Le DFO* a été étudié avec le trastuzumab radiomarqué au ⁸⁹Zr afin d'être testé *in vivo* : la biodistribution montre une fixation au niveau osseux moins intense qu'avec le DFO-Trastuzumab à 144h *post-injection*¹¹². Il est à noter que le trastuzumab-DFO*-⁸⁹Zr est étudié en essai clinique. D'autres dérivés du DFO ont été développés tel que le DFO-Cyclo*.¹¹³

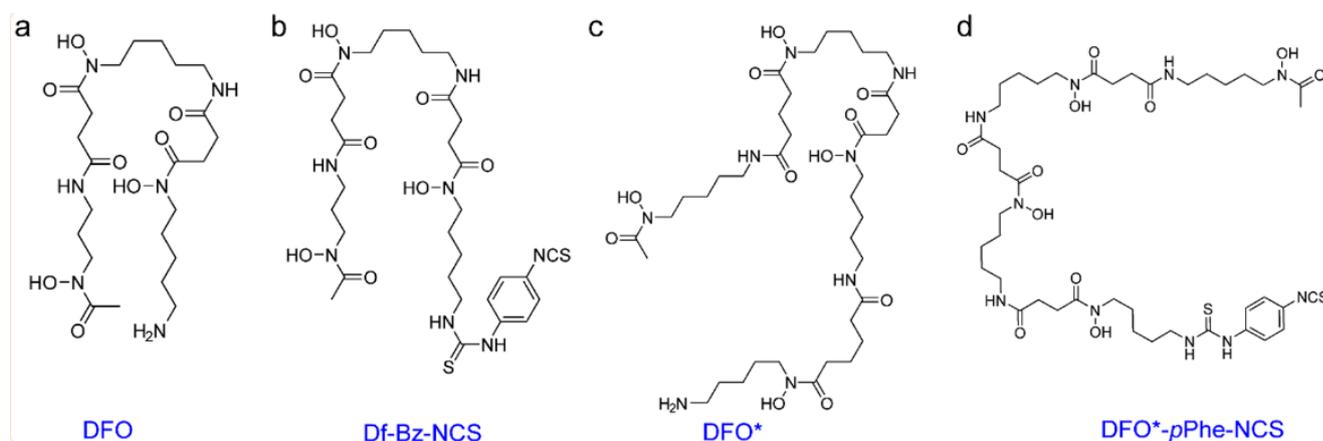


Figure 35 : Structure du ligand desferrioxamine et ses dérivés⁹⁵

2. Le Cuivre 64

a. Physique

Il existe 29 isotopes du cuivre dont le ^{64}Cu qui nous intéresse. Ce dernier est caractérisé par 29 protons et 35 neutrons, et sa période physique est de 12,7h.

Sa désintégration est complexe, le ^{64}Cu est émetteur de plusieurs particules et de photons X et gamma : environ 20% d'émission β^+ qui donne du nickel 64, environ 40% d'émission β^- , et 40% de capture électronique. L'émission gamma est dite « propre », c'est-à-dire que suite à l'émission β^+ les rayonnements gamma de 511keV sont émis, et l'émission gamma de haute énergie (1346keV) provenant de la capture électronique est peu présente (0,47%). Ces caractéristiques sont ainsi adaptées pour une utilisation clinique en TEP, mais également pour une utilisation théranostique. (Figure 36)

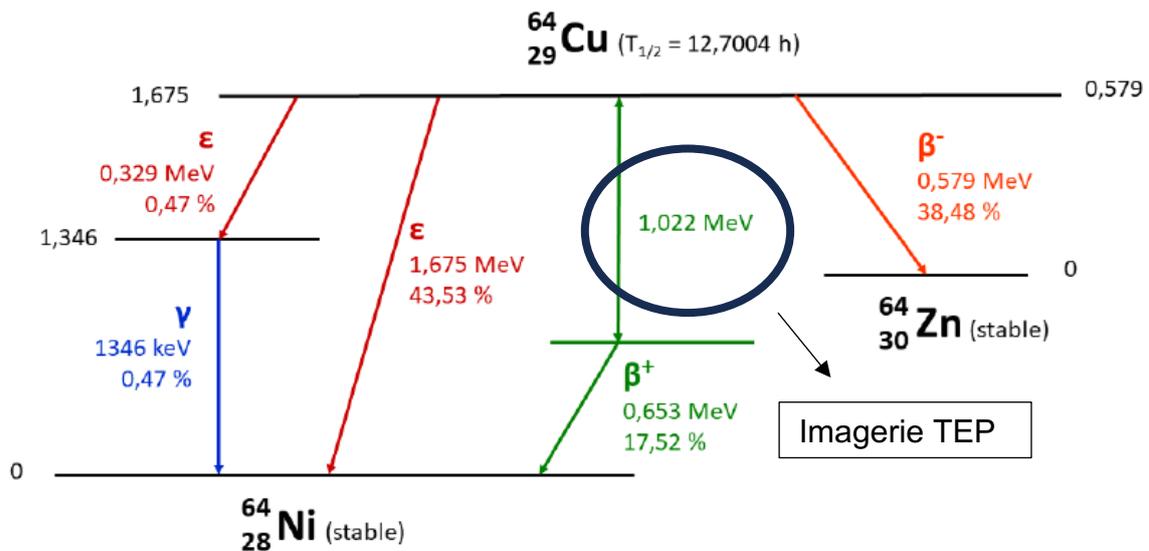


Figure 36 : Schéma de désintégration du ^{64}Cu

La production du cuivre 64 s'effectue soit en réacteur par irradiation du cuivre 63 par des neutrons ($^{63}\text{Cu}(n,\gamma)^{64}\text{Cu}$), soit par accélérateur à partir de la réaction $^{68}\text{Zn}(p,2n)^{67}\text{Ga}$. En revanche, cette dernière méthode de production est peu favorable pour une production du cuivre 64 car le gallium 67 est le produit majoritaire de la réaction, et est caractérisé par une longue période (72h). Une seconde méthode par accélérateur se base sur l'utilisation des deutons sur une cible de nickel 64.

Suite à la production de cuivre, il peut y avoir la présence de contaminants dans la solution. Ceci peut diminuer l'activité spécifique ou l'activité molaire de cuivre, ainsi que la pureté radionucléidique. Les contaminants métalliques les plus retrouvés sont le Zn^{2+} , le Ni^{2+} (suite à la désintégration du ^{64}Cu), le Co^{2+} (secondaire à l'irradiation de la cible), ainsi que le Fe^{3+} (provenant de l'environnement). La présence de ces métaux peut entraîner des interférences dans la réaction de complexation avec le ligand présent sur le vecteur.

b. Chimie

Le cuivre est un élément chimique de numéro atomique 29 qui fait partie de la famille des métaux de transition. Il peut se retrouver en solution sous 3 degrés d'oxydation (+I, +II et +III), et il est le plus souvent retrouvé sous forme +I et +II.

Ces différents degrés peuvent modifier la cinétique et la stabilité des complexes cuivre.

¹¹⁴ Plus précisément, le Cu(I) peut former des complexes relativement instables à cause de son orbitale 3d saturée. Le Cu(I) forme des complexes avec des composés peu polarisables (cyanures, thiolates ou nitriles) et peu solubles dans l'eau. En solution aqueuse, le degré d'oxydation +II est le plus retrouvé, et il forme, avec des amines, imines, ou pyridines, des complexes stables.

Il est important de noter que le potentiel d'oxydoréduction du couple Cu(II)/Cu(I) est assez bas (0,153V/ESH), ainsi ce couple est facilement réduit ou oxydé physiologiquement.

¹¹⁵

c. Métabolisme du Cuivre

Le cuivre est absorbé au niveau digestif, essentiellement au niveau du duodénum, à partir de l'alimentation. Ce cuivre Cu(II) exogène doit être réduit en Cu(I) par des réductases présentes au niveau de la membrane cellulaire. Suite à cette réduction, le cuivre passe en intracellulaire par des protéines de transport Ctr1 (copper transporter 1), dont l'expression est régulée par le taux de cuivre intracellulaire. Une protéine chaperonne Atox1 capte le cuivre afin de l'amener à une enzyme ATPase (ATP7A) qui permet la libération de cuivre au niveau de la circulation générale. La distribution sanguine est réalisée par l'albumine et les α_2 -macroglobuline comme la transcupréine ou la céruléoplasmine.

A partir de la circulation sanguine, le cuivre est pris en charge par des protéines présentes dans les hépatocytes, dont l'Atox1 qui permet de lier le cuivre en excès afin de l'excréter au niveau biliaire. Le cuivre intervient dans le bon fonctionnement de multiples enzymes et protéines, telles que l'enzyme SOD (super oxyde dismutase) qui a un rôle antioxydant, ou la protéine CCO (cytochrome oxydase) qui joue un rôle dans la synthèse de l'ATP ou des ATPases. Suite à la métabolisation hépatique, le cuivre est pris en charge par la céruléoplasmine qui est une α 2-glycoprotéine qui peut complexer 6 atomes de cuivre, elle est alors appelée holocéruléoplasmine et rejoint la circulation sanguine afin de jouer le rôle de cofacteur pour la transferrine.

d. Chélation du Cuivre 64

- **Ligands acycliques**

Les premiers systèmes de ligands utilisés étaient des ligands polyamines carboxylates acycliques, tels que l'EDTA, le DTPA et leurs dérivés (Figure 37). Malgré une bonne stabilité thermodynamique, les études de stabilité dans le sérum utilisant les ligands marqués au ^{67}Cu ont révélé que les complexes n'étaient pas stables dans le sérum humain. En effet, cela pourrait être le résultat de la réduction du Cu(II) en Cu(I) ou de réactions de transchélation.¹¹⁶

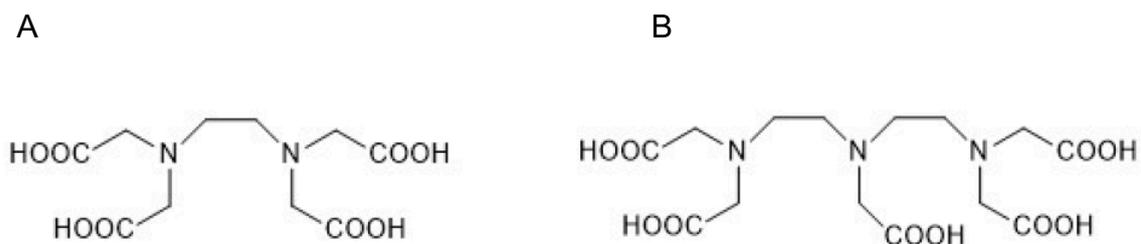


Figure 37 : Structure des ligands EDTA (A) et DTPA (B)

Parmi les autres ligands acycliques qui ont connu un succès modéré en tant que chélateurs du ^{64}Cu , on retrouve les ligands thiosemicarbazones, et notamment l'ATSM¹¹⁷ qui est généralement utilisé pour étudier l'hypoxie cellulaire.¹¹⁸

- **Ligands azamacrocycliques**

Pour améliorer la stabilité *in vivo* des complexes de ^{64}Cu , les chercheurs se sont tournés vers des ligands tétraazamacrocycliques. Le Cu^{2+} étant un acide de Lewis avec une préférence pour les donneurs forts, les ligands polyazamacrocyclique ont dominé sa complexation jusqu'à présent. Au sein de cette famille, ils existent des chélatants tétraazamacrocycliques, tels que les cyclam et les cyclen. Les principaux ligands retrouvés sont l'acide 1,4,7,10-tétraazacyclododécane-1,4,7,10-acide tétraacétique (DOTA), l'acide 1,4,8,11-tétraazacyclotédécane-1,4,8,11-tétraacétique (TETA) et leurs dérivés (Figure 38).

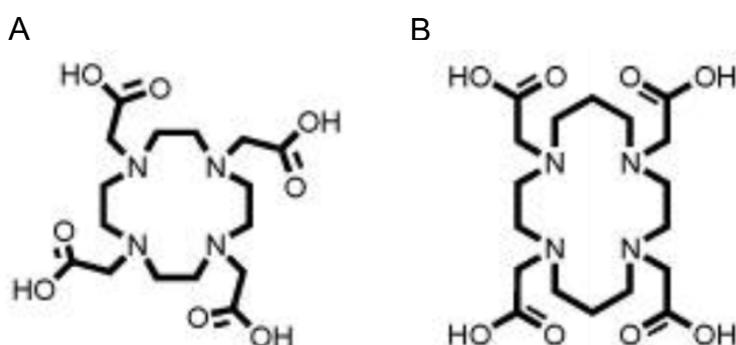


Figure 38 : Structure du DOTA (A) et TETA (B)¹¹⁹

Cette stabilité améliorée est très certainement due à une géométrie plus adaptée avec le ligand macrocyclique qui améliore l'inertie cinétique et la stabilité thermodynamique des complexes de ^{64}Cu . Toutefois, *in vivo* il a été observé un phénomène de relargage du radiométal qui s'accumule dans le foie et les reins des modèles murins.¹¹⁹ Le DOTA est le chélatant le plus retrouvé dans la littérature pour le radiomarquage d'Ac au ^{64}Cu . Le DOTA est fonctionnalisé pour donner le plus souvent le p-SCN-Bn-DOTA (*isothiocyanate activated form*) et le NHS-DOTA (*activated mono-ester form*). Cependant, le DOTA présente une sélectivité relativement faible pour le cuivre, pouvant entraîner des phénomènes de transmétallation. Le ligand TETA et ses dérivés permettent d'améliorer la stabilité *in vivo*, mais restent sensibles à des mécanismes de transchélation, plus particulièrement au niveau hépatique.¹²⁰ Pour finir, le NOTA (Figure 39) a démontré une complexation rapide du cuivre et dans plusieurs études une stabilité *in vivo* augmentée.¹²¹

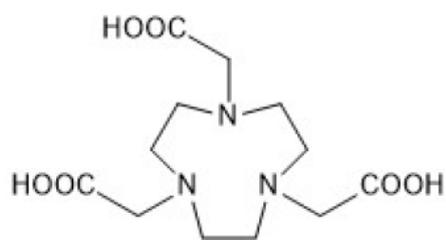


Figure 39 : Structure du NOTA

- **Ligands type sarcophagine**

Une autre classe de ligands qui a attiré l'attention en tant que chélateurs potentiels du ^{64}Cu sont les ligands de type hexaazamacrobicyclique ou sarcophagine. (Figure 40) Ces chélatants, dérivés du TETA, ont démontré une grande stabilité thermodynamique et possèdent une bonne sélectivité pour le cuivre. Néanmoins, la cinétique de complexation est plus lente à température ambiante.

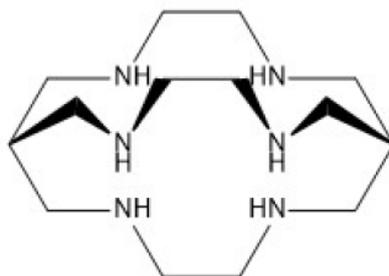


Figure 40 : Structure sarcophagine

Des expériences de stabilité dans du sérum d'un complexe sarcophagine- ^{67}Cu , réalisées avec du sérum humain, ont montré une très bonne stabilité, en effet, 98 % de la radioactivité demeurait complexée après 7 jours. Toutefois, en raison d'une synthèse difficile, leur étude est restée limitée.

- **Ligands pontés du cyclam et du cyclen**

Plus récemment, les ligands cyclam et cyclen, ainsi que leurs dérivés ont attiré l'attention pour complexer le cuivre. Ils sont composés d'un pont éthyle qui permet de relier les fonctions amines N1 et N4, c'est pourquoi ils sont également nommés « *cross-bridged* ». (Figure 41)

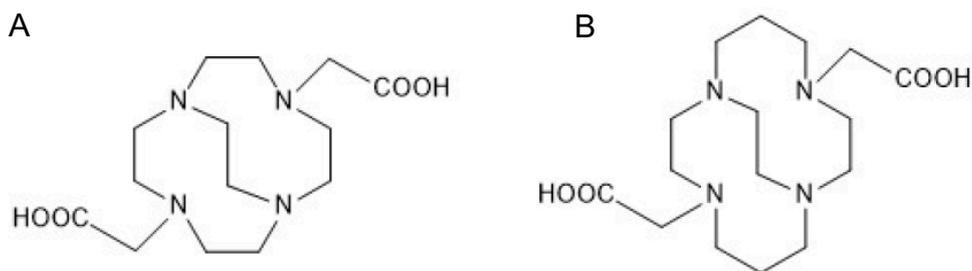


Figure 41 : Structure des ligands CB-DO2A (A) et CB-TE2A (B)

Ces chélatants macrobicycliques ont été synthétisés pour chélater des cations métalliques comme Li^+ , Cu^{2+} et Zn^{2+} . Parmi ces les ligands pontés, il a été développé des dérivés du DOTA et du TETA, qui sont respectivement le B-DO2A et le CB-TE2A (Figure 40). Des études ont montré que la stabilité thermodynamique et leur inertie cinétique *in vitro* sont supérieures à celles de leurs parents non pontés.¹²² De plus, avec le Cu-CB-TE2A, il a été montré une excellente résistance à la réduction du cuivre de sa forme Cu(II) à la forme Cu(I).¹²³ Cependant, en raison de conditions de fonctionnalisation sévère, dont le chauffage à 95°C , l'utilisation du CB-TE2A pour le marquage d'Ac est limitée.¹²² Il est à noter qu'un dérivé plus récent, le CB-TE1A1P [(1,4,8,11-tétraazacyclotétradécane-1-(acideméthanephosphonique)-8 (acideméthanecarboxylique) (Figure 42) peut chélater le ^{64}Cu à température ambiante.

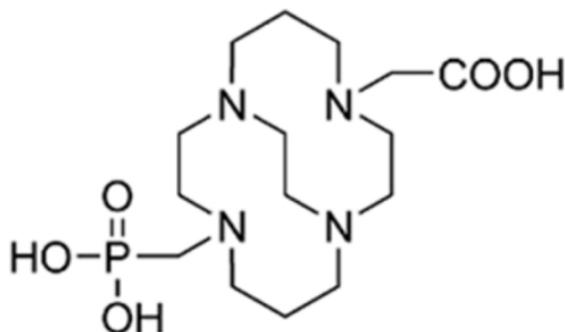


Figure 42 : Structure du CB-TE1A1P

En conclusion, depuis plusieurs années l'immunoTEP est un outil en développement constant. Face à l'arrivée de multiples immunothérapies, il offre des perspectives de personnalisation pour la prise en charge des patients.

La conception de traceur immunoTEP repose sur le choix du vecteur, qui doit être adapté à la pathologie étudiée, et sur le choix du radionucléide, qui doit présenter une période adaptée à la biodistribution de l'Ac, et des modalités d'émission compatibles

avec l'imagerie. Afin de répondre à ces deux impératifs, l'utilisation d'un chélatant peut se révéler nécessaire. Or, choisir le chélatant idéal et respecter les particularités chimiques des vecteurs et des radioéléments peut se révéler complexe. Le radiomarquage d'Ac nécessitent de réaliser des mises au point.

Dans la partie expérimentale de cette thèse, nous allons présenter notre travail de mise au point du radiomarquage du tocilizumab et de l'atézolizumab au ^{89}Zr et ^{64}Cu .

Chapitre 4 : Mise au point du radiomarquage au Zirconium 89 et au Cuivre 64 d'anticorps monoclonaux : le tocilizumab et l'atézolizumab

I. Introduction

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à deux AcM, tous deux de type IgG1 : le tocilizumab et l'atézolizumab. Comme présenté dans le Chapitre 2 de cette thèse, ces AcM sont utilisés en thérapie dans des pathologies auto-immunes et oncologiques. Le tocilizumab, anti-IL-6R cible les mécanismes inflammatoires de l'organisme et l'atézolizumab, anti-PD-L1, est un inhibiteur de checkpoint immunitaire.

Ces traitements, bien qu'efficaces, ne permettent pas d'obtenir une réponse clinique chez tous les patients. C'est pourquoi ils apparaissent comme de parfaits candidats pour tester leur potentiel immunoTEP afin de développer de nouveaux outils diagnostiques et théranostiques. L'objectif de notre travail était donc de mettre au point le tocilizumab et l'atézolizumab radiomarqués en vue de disposer d'outils utilisables en immunoTEP.

La première étape de ce travail a été l'optimisation des conditions de radiomarquage. Pour cela nous avons choisi de réaliser le radiomarquage au ^{89}Zr et au ^{64}Cu car ces deux radioéléments sont complémentaires. En effet, de par sa période longue (78,4h), le ^{89}Zr permet de réaliser une étude *in vivo* sur une plus longue durée, ce qui est intéressant pour l'étude pharmacocinétique chez l'animal. Le ^{64}Cu , quant à lui, grâce à sa période de 12,7h, permet de développer un radiotraceur plus raisonnable sur le plan dosimétrique pour un éventuel passage à l'homme. De plus, il permet une gestion plus simple au niveau de l'animalerie et des déchets.

Dans un second temps, nous avons évalué la stabilité *in vitro* des AcM radiomarqués par les 2 radioéléments ainsi que leur immunoréactivité et leur affinité afin de s'assurer que le radiomarquage n'altère pas la capacité de liaison des Ac à leur cible.

Nous avons ensuite voulu, dans le cadre de la preuve de concept, étudier la fixation du tocilizumab radiomarqué dans un modèle murin de polyarthrite rhumatoïde en vue d'évaluer son intérêt en immunoTEP.

II. Matériel et méthodes

1. Matériel

a. Ac étudiés

Dans ce travail, 4 Ac ont été utilisés :

- L'atézolizumab (Tecentriq®, Roche) : AcM anti-PD-L1 (Ac anti-PD-L1), de type IgG1.
- Le tocilizumab (Roamctemra®, Roche) : AcM anti-récepteur à l'IL6 humanisé (Ac anti-IL6hR), de type IgG1.
- L'Ac anti-récepteur murin à l'IL6 (sc-374259, Santa Cruz) : AcM murin de type IgG1 (Ac anti-IL6mR).
- Le palivizumab (Synagis®, AstraZeneca) : AcM humanisé recombinant de type IgG1, dirigé contre un épitope du site antigénique A de la protéine de fusion du virus respiratoire syncytial (VRS). Il a joué le rôle d'Ac contrôle (Ac irrelevant).

b. Radioéléments

Le cuivre 64 a été commandé auprès d'ARRONAX GIP dans le cadre du Labex Iron avec le CHU de Toulouse. Le radionucléide était conditionné dans du HCl 0,1M et calibré à 3700MBq dans 1,3mL à 9h le jour de la livraison.

Le zirconium 89 a été fourni par PerkinElmer, sous forme d'oxalate de zirconium 1M. L'activité commandée était de 37 à 111 MBq dans 0,1mL, calibrée à 18h au jour de livraison.

c. Réactifs

Les chélatants utilisés provenaient tous de Macrocyclus : DFO-SCN (B-705), DOTA-NHS (B-280), DOTA-SCN (B-205), NOTA-SCN (B-605).

Pour la mise au point du radiomarquage au ⁸⁹Zr, deux types de réactifs ont été testés : réactifs *metal free* (TraceSELECT®, Fisher), c'est-à-dire, sans présence de métaux contaminants, et non *metal free*.

Pour la mise au point du radiomarquage au ⁶⁴Cu, tous les réactifs utilisés sont *metal free* (TraceSELECT®, Fisher). Les réactifs *metal free* seront indiqués par « Mf » dans la partie méthode.

La concentration de protéine a été évaluée par spectrophotométrie à l'aide d'un kit commercial BCA Protein Assay Kit (ThermoFisher).

Pour l'analyse FACS, deux anticorps ont été utilisés : l'Ac anti-PD-L1 et l'Ac anti-IL-6R (ThermoScientific). Ces Ac ont été respectivement conjugués aux fluorochromes PE et PenCpE710 (ThermoScientific). Le marqueur de viabilité LIVE/DEAD® (ThermoScientific) a également été utilisé afin de différencier les cellules vivantes des cellules mortes.

Des Ag PD-L1 (PEP0463, Invitrogen) ont été utilisés afin de réaliser des tests de binding sur plaque.

d. Équipements

Le système de chromatographie (Agilent, Lablogic) liquide à haute performance à exclusion de taille (SE-HPLC) utilisé comprenait une pré-colonne Agilent AdvanceBio SEC 300 Å connectée en série avec une colonne d'exclusion de taille Agilent AdvanceBio SEC 300 Å, 2,7 µm. Le détecteur de radioactivité associé était une sonde d'iodure de sodium (Lablogic).

Un radiochromatographe Scan-RAM (Lablogic) a été utilisé pour la chromatographie en couche mince. Les comptages d'échantillons ont été réalisés avec un compteur gamma Wizard (PerkinElmer). Pour l'analyse FACS, un cytomètre en flux a été utilisé (BD LSRFortessa X-20).

Les expériences *in vivo* ont été réalisées à l'aide d'une caméra microTEP NanoScan PET/CT (Mediso) au Centre régional d'exploration fonctionnelle et de ressources expérimentales (CREFRE).

e. Cellules

Pour les études de binding, 2 types de cellules ont été testés : une lignée cellulaire U266 et une lignée cellulaire MDA, elles ont été sélectionnées pour leur expression antigénique. Les lignées cellulaires ont été gracieusement fournies par l'équipe Inserm UMR1037 du Centre de Recherches en Cancérologie de Toulouse.

- Culture de la lignée U266

Le milieu de culture approprié a été préalablement préparé dans des conditions stériles : RPMI 1640 + Sodium pyruvate 1% + Glutamine 1% + SVF décomplémenté 15%. Les cellules ont été maintenues entre 10^5 et 10^6 cellules/mL à 37°C dans une atmosphère à 5% de CO₂.

- Culture de la lignée MDA-MB231

Le milieu de culture approprié a été préalablement préparé dans des conditions stériles : Leibowitz + SVF décomplémenté 10% + Penicilline/Streptavidine 1%. Les cellules ont été maintenues entre $2 \cdot 10^4$ et $6 \cdot 10^4$ cellules/cm² à 37°C dans une atmosphère à 5% de CO₂.

2. Méthodes :

a. Mise au point du dosage des Ac par HPLC et spectrophotométrie BCA

Une technique de dosage d'Ac par HPLC a été développée à l'aide d'une phase mobile de PBS/NaCl 150mM, en mode isocratique avec un débit de 0,7 mL/min. L'élution a été suivie par spectrophotomètre UV à plusieurs longueurs d'onde différentes (210, 230 et 250 nm), et par détecteur de radioactivité.

Les gammes étalons ont été mises au point avec des concentrations variant de 0,03 mg/mL à 2,0 mg/mL. La mesure de chaque point de la gamme a été réalisé 3 fois. (Figure 43)

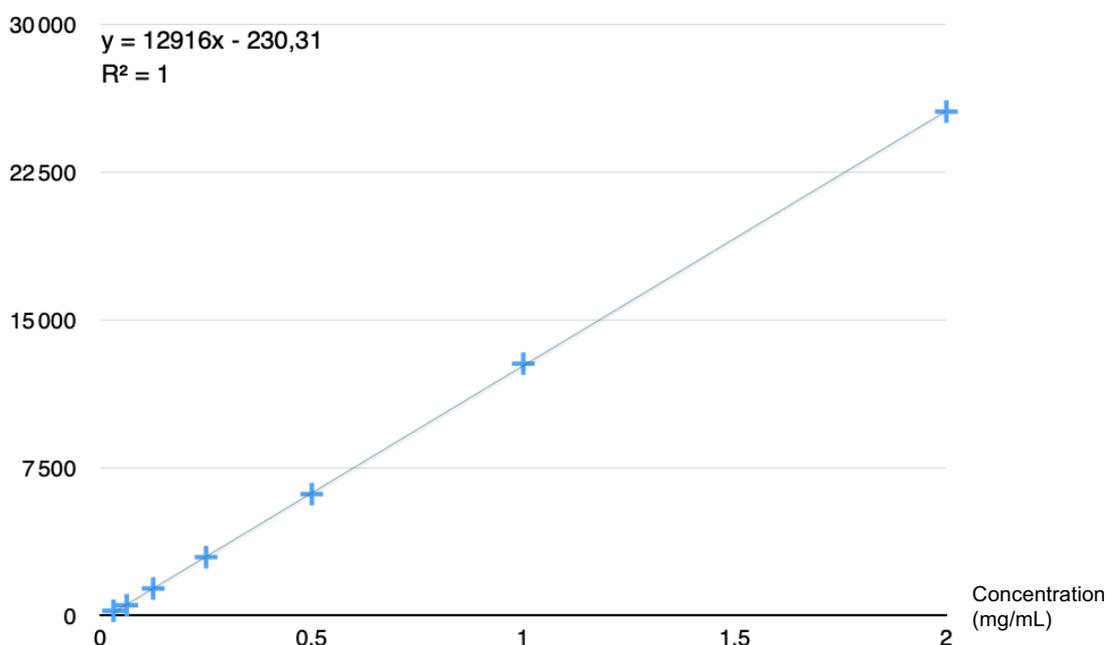


Figure 43 : courbe de calibration du pavilizumab commercial : absorbance en fonction de la concentration en Ac (mg/mL), UV à 230nm

La concentration en protéines a également été déterminée par analyse spectrophotométrique (562nm) en utilisant le kit commercial BCA Protein Assay Kit. Ce kit est basé sur une réaction colorimétrique des protéines avec l'acide bicinchoninique (BCA) permettant la quantification des protéines totales à partir d'une gamme réalisée à l'aide d'une solution standard d'albumine. (Figure 44)

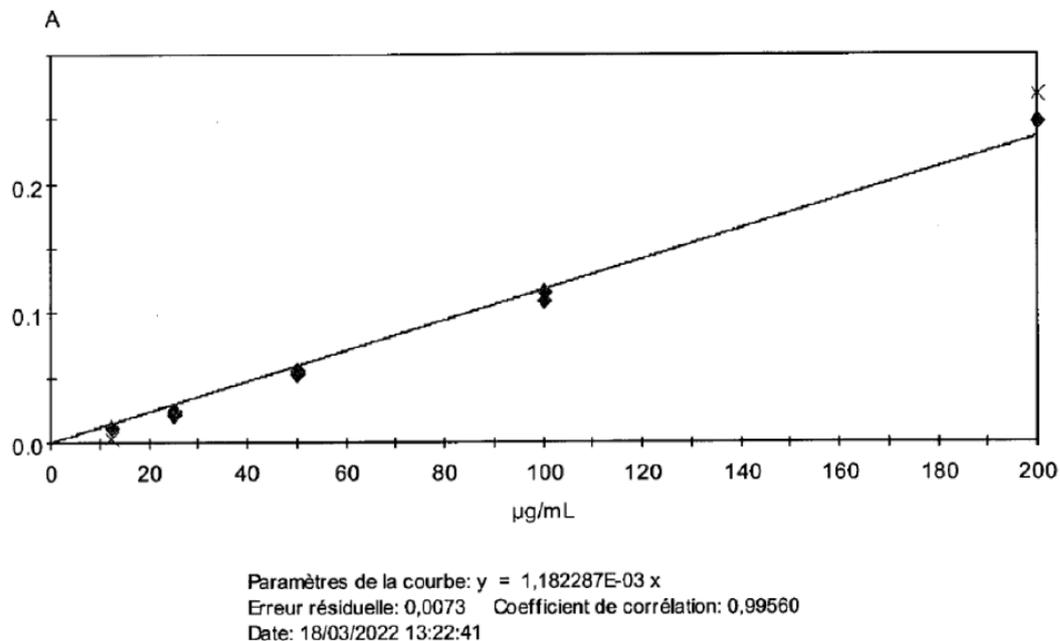


Figure 44 : Gamme étalon réalisée par le kit BCA pour la mise au point du dosage des Ac à 562nm

b. Fonctionnalisation des Ac

- Pour le ^{89}Zr

La fonctionnalisation des Ac a été effectuée sur la base de 2 protocoles de la littérature : l'étude de Vosjan *et al.* de 2010, et le travail de Sharma *et al.* de 2021. Plusieurs conditions de fonctionnalisation ont été testées en modifiant le milieu réactionnel, la quantité d'Ac et de DFO.

i. Transfert de l'Ac vers le tampon de marquage :

Pour les solutions d'Ac humains, trois lavages successifs avec 4ml de milieu par ultracentrifugation avec Amicon Ultra 4 (Merck) (4000g, 20min, 15°C) ont été réalisés. Un volume final d'environ 150 µL a été obtenu et complété avec 200µl de rinçage du filtre avec le milieu (volume final : 350µl). L'Ac murin a été transféré par

ultracentrifugation (7325g, 10 min, 15°C) à l'aide Amicon Ultra 0,5 afin de limiter de la perte d'Ac.

Deux conditions ont été testées :

- La première condition était composée du milieu inspiré de Vosjan *et al* (milieu n°1) : Na₂CO₃ 0,1M (pH 8,9-9,1). Les tampons et solvants ont été préparés avec de l'eau ultra pure (18,5mΩ.).
- La seconde condition testée correspondait au milieu du protocole de Sharma *et al* (milieu n°2), c'est-à-dire du PBS Mf (pH ajusté à 8,9-9,1 avec du Na₂CO₃ Mf 2M).

La concentration en protéines de la solution obtenue après transfert a été déterminée par la méthode BCA.

ii. Chélation :

L'Ac a été incubé avec le DFO (ratio molaires de 1:3 ou 1:10) dans 1mL de milieu réactionnel pendant 30 min à 37°C sous agitation douce (550 rpm), le DFO étant préalablement dissous dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) pour obtenir une concentration de 2mM. Le milieu d'incubation était différent en fonction de la condition testée. Pour la condition n°1, l'Ac était incubé avec le DFO dans du Na₂CO₃ 0,1M (pH 8,9-9,1). Pour la condition n°2, la chélation a eu lieu dans du PBS Mf (pH 8,9-9,1).

iii. Purification :

Suite à la chélation, 3 lavages successifs avec 0,5mL de milieu de l'Ac par centrifugation (7325G, 10min) sur Amicon Ultra 0,5 ont été réalisés.

La purification de l'Ac chélaté selon la condition n°1 a été réalisée à l'aide d'une solution d'acétate de sodium 0,25M (pH 5,4-5,6) et d'acide gentisique 5mg/mL.

La condition n°2 a demandé du PBS Mf. Les Ac fonctionnalisés (DFO-Ac) ont été caractérisés par HPLC et conservés à 4°C pour une utilisation ultérieure.

- Pour le ⁶⁴Cu

i. Transfert de l'Ac vers le tampon de marquage :

Le même principe que développé précédemment a été utilisé. Trois lavages successifs ont été réalisés : pour le premier lavage, le milieu utilisé était du carbonate de sodium-

EDTA (pH 8,5-9), afin de complexer les éventuels métaux présents dans la solution d'Ac. Les deux lavages suivants ont été réalisés avec du Na_2CO_3 0,5M (pH 8,9-9,1). La concentration en protéines de la solution obtenue a été déterminée par BCA.

ii. Chélation :

L'Ac a été incubé avec différents chélatants (ratio molaires de 1:10/1:20/1:40) : DOTA-SCN, DOTA-NHS, NOTA-SCN pendant 6 heures à 40°C ou à température ambiante toute la nuit, les chélatants étant préalablement dissous dans du Na_2CO_3 0,5M à une concentration finale 10mM.

iii. Purification :

Afin de purifier les Ac chélatés, 3 lavages successifs avec 0,5mL d'acétate d'ammonium 150mM (pH 6) par centrifugation (7325G, 10min) sur Amicon Ultra 0,5.

c. Radiomarquage de l'Ac

- Radiomarquage au ^{89}Zr

Différentes conditions ont été testées en modifiant la quantité d'Ac (x mg) et l'activité de radiomarquage (a). Les Ac fonctionnalisés ont été radiomarqués en ajoutant successivement les réactifs suivants :

- Un volume (V_A) contenant l'activité souhaitée (a) de ^{89}Zr (maximum 100 μL)
- Un volume de 100 μL - V_A d'acide oxalique 1M
- Un volume de 45 μL de Na_2CO_3 2M

Le mélange obtenu a été agité puis incubé pendant 3min à température ambiante.

Puis il a été ajouté :

- Un volume de 0,15mL d'HEPES,
- x mg d'Ac
- Un volume de 0,35mL d'HEPES.

Le produit final a été agité par vortex puis incubé pendant 1h à 3h à température ambiante.

La pureté radiochimique (PRC) a été déterminée par CCM avec une phase mobile de : citrate de sodium 0,1 M pH-5,5 et un support ITLC-SG à différents temps d'incubation. L'Ac radiomarqué reste au point de dépôt (rapport frontal (Rf) = 0) alors que le ^{89}Zr libre migre avec le front de solvant (Rf = 1). Si la PRC était inférieure à 90%, l'Ac radiomarqué était purifié par ultracentrifugation dans Amicon Ultra 0,5 (7325g, 10 min, 15°C).

- **Radiomarquage au ^{64}Cu**

Différentes conditions ont été testées en modifiant l'activité de radiomarquage (a). Les Ac fonctionnalisés ont été radiomarqués selon le protocole suivant :

Dans des tubes (sans présence de métaux (Nalgène, ThermoScientific)) le volume souhaitée de CuCl_2 (25 ou 50MBq) a été tamponnée à pH=6 avec de l'acétate d'ammonium 2,5M. Il a ensuite été ajouté 250ug d'Ac puis le mélange a été vortexé et incubé 30 minutes à 40°C.

La PRC a été mesurée par CCM avec une phase mobile de citrate de sodium 0,1 M pH-4,5 et un support ITLC-SG à différents temps d'incubation. L'Ac radiomarqué reste au point de dépôt (apport frontal (Rf) = 0) alors que le ^{64}Cu libre migre avec le front de solvant (Rf = 1).

c. Études *in vitro*

i. Étude de stabilité

La stabilité *in vitro* des Ac radiomarqués a été évaluée à différents temps après conservation à température ambiante dans le milieu réactionnel d'origine de l'Ac, dans du sérum humain et dans du NaCl 0,9% (dilution au 1/10^{ème}). La PRC a été mesurée par CCM toutes les 24h jusqu'à J5 pour le ^{89}Zr et jusqu'à J2 pour le ^{64}Cu (PRC toutes les heures pendant 3h puis toutes les 24h). Chaque expérience a été réalisée trois fois.

ii. Étude d'affinité

- FACS

L'expression antigénique de PD-L1 et de l'IL-6R sur les cellules MDA-MB231 et les cellules U266 ont été analysées par FACS dans différentes conditions : sur cellules seules (contrôles) et sur cellules pré-incubées avec de l'interféron gamma (IFN) (10ng/mL) ou du TNF (10ng/mL).

Pour l'Ag PD-L1, il a été utilisé un Ac anti-PD-L1 couplé au fluorochrome PE (dilué à 1/50° dans le tampon FACS). Pour l'IL-6R, l'Ac anti-IL-6R a été conjugué avec PenCpE710 (dilué à 1/50° dans le tampon FACS). Le marqueur de viabilité LIVE/DEAD® (ThermoScientific) a été utilisé pour différencier les cellules vivantes et les cellules mortes (dilué à 1/100° dans le tampon FACS). Pour les cellules U266, chaque puit contenait environ $5 \cdot 10^5$ cellules/mL, pour les cellules MDA-MB231 la concentration était de $7 \cdot 10^4$ cellules/mL.

De plus, nous avons réalisé 6 puits contrôles : cellules seules, LIVE seul, PDL1-PE, IL6R-PenCpE710, contrôle PD-L1-FMO (pour Fluorescence Minus One : contrôle contenant tous les fluorochromes conjugués sauf PD-L1-PE), et contrôle IL-6R-FMO.

- Détermination du k_D

Le k_D , ou constante de dissociation, représente l'affinité, et plus précisément dans notre cas, l'immunoaffinité, de l'Ac pour sa cible. La détermination du k_D a été réalisée par comptage de radioactivité en utilisant deux méthodes : une utilisant des « cellules » exprimant l'Ag et une utilisant des Ag fixés dans des micropuits.

Méthode sur cellules :

L'étude de binding a été réalisée d'après la méthode de RadiImmunoAssay (RIA) de Lindmo *et al.* de 1984 et 1986.

Pour déterminer le k_D , des quantités croissantes d'Ac radiomarqués ont été incubées avec une quantité fixe de cellules. Différentes quantités de cellules ont été testées : 1 million ou 2 millions de cellules, contenues dans un volume de 250 μ L de PBA-BSA 3% par puit.

Afin de déterminer la liaison spécifique, l'expérience a été réalisée en présence ou non d'un large excès d'Ac froid.

- Cellules pré-incubées en PBS-BSA 3% : mesure de la liaison totale
- Cellules pré-incubées pendant 1h avec de l'Ac froid afin de saturer les sites spécifiques (en excès de 100 fois la concentration d'Ac radiomarqué) : mesure de la liaison non spécifique.

Les solutions d'Ac radiomarqués ont été diluées en série dans du PBS-BSA 3% (3,125 à 25µg/ml).

Les cellules ont été incubées avec l'Ac radiomarqué (125 µL) pendant 3h à température ambiante.

Après centrifugation (160G,10min), le culot cellulaire a été séparé du surnageant. La radioactivité du culot cellulaire et du surnageant ont été mesurées à l'aide du compteur gamma. La liaison spécifique a été déduite par soustraction de la liaison non spécifique à la liaison totale.

Méthode sur Ag fixés :

Pour l'atézolizumab, l'étude de binding a également été testé sur Ag PD-L1, préalablement coatés sur plaque, en suivant la méthode précédente. Succinctement, une quantité d'Ag de 10µmol/puit a été fixée dans des micro-puits. Pour déterminer la liaison non spécifique, une partie des puits a été pré-incubée par de l'Ac froid pendant 1h. Les solutions d'atézolizumab radiomarqués ont été diluées en série dans du PBS-BSA 3% à différentes concentrations allant de 3,125 à 10 µg/ml, puis déposées dans les différents puits. La liaison spécifique a été déduite par soustraction de la liaison non spécifique à la liaison totale.

- Détermination de la fraction immuno-réactive IRF

L'IRF représente la fraction de l'Ac radiomarqué capable de se lier à l'Ag. Elle est déterminée en incubant des quantités croissantes d'antigènes avec une quantité fixe d'Ac.

Les cellules ont été diluées en série dans du PBS-BSA 3% en commençant à 2 millions de cellules à 62 500 cellules dans un volume de 250 µL de PBA-BSA. Deux conditions ont été mises en place :

- Cellules en PBS-BSA 3% : mesure de la liaison totale
- Cellules pré-incubées pendant 1h avec de l'Ac froid

La concentration d'Ac radiomarqués était de 25µg/ml dans du PBS-BSA 3%. Comme pour l'étude de binding, après incubation (3h, température ambiante) et centrifugation, les activités des culots cellulaires et des surnageants ont été mesurées.

d. Étude *in vivo*

Pour les tests *in vivo*, nous avons travaillé sur l'Ac anti-récepteur murin à l'IL6 de type IgG1 (Ac anti-IL-6mR) car le tocilizumab a montré dans plusieurs études une affinité diminuée pour l'IL-6R murin¹²⁴. Il a également été injecté un anticorps contrôle, dit irrelevant, le pavilizumab.

- **Modèle murin d'étude**

Le modèle préclinique a été réalisé en collaboration avec la société IMAVITA. Il s'agit d'un modèle murin de PR induit par collagène de type 2, sur des souris DBA/1.¹²⁵

Toutes les expériences *in vivo* ont été réalisées conformément à la législation sur l'éthique animale, et tous les efforts ont été faits pour minimiser la souffrance des animaux. Le protocole a été déclaré sur la plateforme APAFIS.

Trois groupes ont été mis en place : 1 groupe sain contrôle (n=4), 1 groupe SHAM (n=2), et 1 groupe malade (n=6).

Le principe de l'immunisation se déroule en deux étapes :

- L'immunisation à J0 :

Une émulsion contenant 1,5mL de collagène de type 2 de poulet (préalablement dissous dans de l'acide acétique 0,05M, à une concentration de 8mg/mL), et 1,5mL d'adjuvant complet de Freund (CFA), a été réalisée. Le groupe malade s'est vu injecter 50 µL de l'émulsion à 1,5 cm de la base de la queue en intradermique, après une anesthésie préalable par isoflurane. Les souris SHAM ont reçu dans les mêmes conditions 50µL d'acide acétique et de CFA.

- Le « boost » à J20 :

Comme précédemment, une émulsion a été préparée avec du collagène de type 2 et de l'adjuvant incomplet de Freund (IFA) (ratio 1:1). Les souris malades se sont vues injecter 50 µL de cette préparation, et les souris SHAM ont eu 50 µL d'acide acétique et d'IFA.

Chaque animal a été évalué quotidiennement d'après une grille de score physiologique, clinique et comportemental afin d'intervenir au plus tôt dans la prise de décision de poursuite du protocole. Le suivi de l'inflammation chez les souris a été observé quotidiennement afin d'observer les lésions et de réaliser une notation des scores arthritiques. Lorsque les animaux commençaient à avoir des atteintes cliniques, nourriture et boisson ont été apportées sous forme de gels placés dans la cage, afin de limiter les déplacements.

ii. Imagerie TEP

- Imagerie au ^{18}F -FDG du modèle murin de PR

Afin d'étudier l'inflammation liée aux lésions d'arthrites, une imagerie par ^{18}F -FDG a été réalisée sur les souris malades et les souris SHAM. Après une période de jeûne de 4h, une injection de 7,2 à 8,6 MBq de ^{18}F -FDG par animal a été effectuée en intraveineux dans la veine caudale. Les souris ont ensuite été anesthésiées à l'isoflurane puis placées dans la cellule de confinement chauffée à 36°C pour une acquisition TEP de 15 minutes, 1h post-injection du ^{18}F -FDG, suivie ou précédée d'une acquisition scanner CT de 6 minutes. Les images ont été analysées avec le logiciel Sisyphe, en mesurant les volumes d'intérêt, « Volume of Interest » (VOI), des quatre pattes et en les normalisant par le VOI du cœur, afin de pouvoir comparer les souris entre elles.

- Évaluation de la biodistribution par imagerie TEP

Trois groupes d'animaux ont été comparés : 1 groupe de souris PR (n=6), 1 groupe de souris SHAM (n=4), et 1 groupe de souris saines (n=2) (Figure 36). Le groupe de souris PR et le groupe de souris SHAM a reçu soit de l'Ac anti-IL6mR (respectivement, n=3 et n=2), soit de l'Ac irrelevant (respectivement n=3 et n=2), et les souris saines de l'Ac irrelevant. (Figure 45)

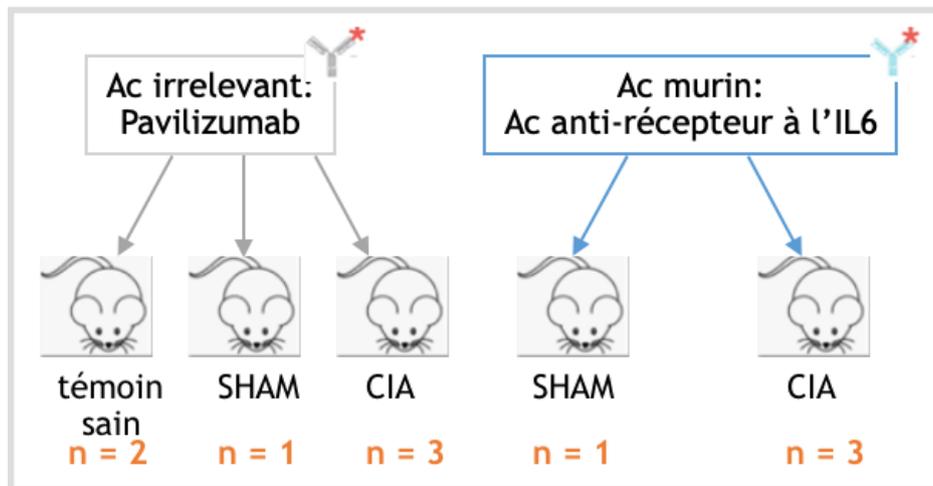


Figure 45 : Répartition des modèles murins (CIA), contrôles (SHAM), et témoins sains en fonction des Ac radiomarqués (pavilizumab, Ac anti-IL-6mR) injectés

Les souris ont reçu 0,3 à 0,4MBq d'Ac radiomarqué dilué dans 100 μ L de solution saline stérile à 0,9 % par injection intraveineuse dans la veine caudale. L'acquisition des images a été réalisée 4h post-injection (J0) puis à J1, J3 et J5. Les données ont été acquises pendant 30 à 40 minutes.

e. Statistiques

Les tests statistiques ont été réalisés avec des tests non paramétriques après avoir vérifié l'absence de normalité par Kolmorov-Smirnov : test de Mann Whitney pour la comparaison de deux échantillons indépendants, et test de Wilcoxon pour la comparaison de deux échantillons appariés. Les graphiques et calculs ont été effectués sur Excel et GraphPad.

III. Résultats

La mise au point des radiomarquages au ^{89}Zr et au ^{64}Cu a été réalisée sur un seul Ac, qui sera précisé dans les parties respectives. Suite à cette mise au point, les conditions de radiomarquages retenues ont été utilisées pour le marquage des différents Ac. En effet, nous avons établi que le radiomarquage pouvait être applicable à tous les Ac devant leur structure commune (IgG1). Néanmoins, nous ne pouvons pas exclure une possible influence du milieu initial des Ac (milieu commercial) malgré le lavage. C'est pour cela qu'il sera important de réaliser par la suite, une étude de stabilité, d'affinité et d'immunoréactivité pour chaque Ac et condition de radiomarquage (^{89}Zr et ^{64}Cu).

1. Fonctionnalisation et radiomarquage des anticorps

a. Mise au point du radiomarquage au ^{89}Zr

Afin de déterminer les conditions optimales de radiomarquage, plusieurs protocoles ont été testés en faisant varier les milieux réactionnels (milieu 1 ou 2), le ratio molaire de DFO-Ac (DFO 1:3; DFO 1:10), la quantité d'Ac lors de chélation (2 ou 5 mg) ou l'activité spécifique (16-18 MBq/mg ou 37 MBq/mg). (Tableau 4)

	Ac (mg)	Ratio molaire Ac/DFO	Milieu réactionnel
Condition n°1 (Vosjan and al. 2010)	2	1:3	- Na ₂ CO ₃ 0,1M
	2	1:10	- Acide gentisique 5mg/mL avec acétate de sodium 0,25M, pH 5,4-5,6
Condition n°2 (Sharma and al. 2021)	2	1:3	- Na ₂ CO ₃ 2M
	5	1:3	- PBS Mf, pH 8,9-9,1
	2	1:10	- V _{PBS Mf} = 1mL - V _{Ac}

Tableau 4 : Récapitulatif des conditions testées lors de la mise au point du radiomarquage au ^{89}Zr .
Ac : anticorps ; DFO : desferrioxamine

La mise au point des conditions d'incubation a été réalisée avec le tocilizumab.

i. Choix des conditions de chélation du DFO

- Choix du milieu et du temps d'incubation

Dans chaque protocole, les PRC obtenues en fonction du milieu sont récapitulées dans le tableau 5.

	Conditions de chélation		Conditions de radiomarquage		PRC t1h PM (%) (m+/- s _d)	PRC t2h PM (%) (m+/- s _d)		
	Ratio molaire	Ac (mg)	Quantité d'Ac (mg)	Activité spécifique (MBq/mg)				
Condition n°1	1:3	2	0,5	37	0,20	0,00		
				18,8	0,80	1,00		
	1:10	2		37	4,10	8,00		
				18,8	37,50	32,00		
Condition n°2	1:3	2 (n=3)		16	90,56 +/- 13,41	94,44 +/- 7,13	99,71 +/- 0,60	
		5 (n=8)						
	1:10	2 (n=3)						100 +/- 0,00
		5 (n=3)						99,67 +/- 0,58

Tableau 5 : PRC obtenues sur 2h en fonction des conditions de chélation et de radiomarquage testées. Condition n°1 : milieu réactionnel de Vosjan et al ; Condition n°2 : milieu réactionnel de Sharma et al ; Ac : anticorps ; PM : post-marquage ; PRC : Pureté radiochimique ; m : moyenne, sd : écart type

Les radiomarquages avec le milieu 1 permettaient d'obtenir des PRC très inférieures aux radiomarquages avec le milieu 2, même en augmentant le temps d'incubation et en changeant les quantités de DFO. Pour une même quantité de DFO, un rendement de 100% a été obtenu avec le milieu 2, alors qu'avec le milieu 1, au mieux, un rendement de 38% a été obtenu à 2h. Devant ces résultats, le **milieu 2 a donc été retenu** pour la suite des optimisations.

Afin d'établir le temps d'incubation optimal de l'Ac avec le ⁸⁹Zr, nous avons étudié le rendement de marquage au cours des deux premières heures d'incubation. Pour la chélation comprenant un **ratio molaire de DFO 1:3** (quel que soit la quantité d'Ac initialement chélaté), une **différence significative entre 30 min et 2h d'incubation a**

été observée (*, Wilcoxon, $p < 0,001$). Cette différence n'a **pas été retrouvée pour le ratio molaire de 1:10** (Figure 46).

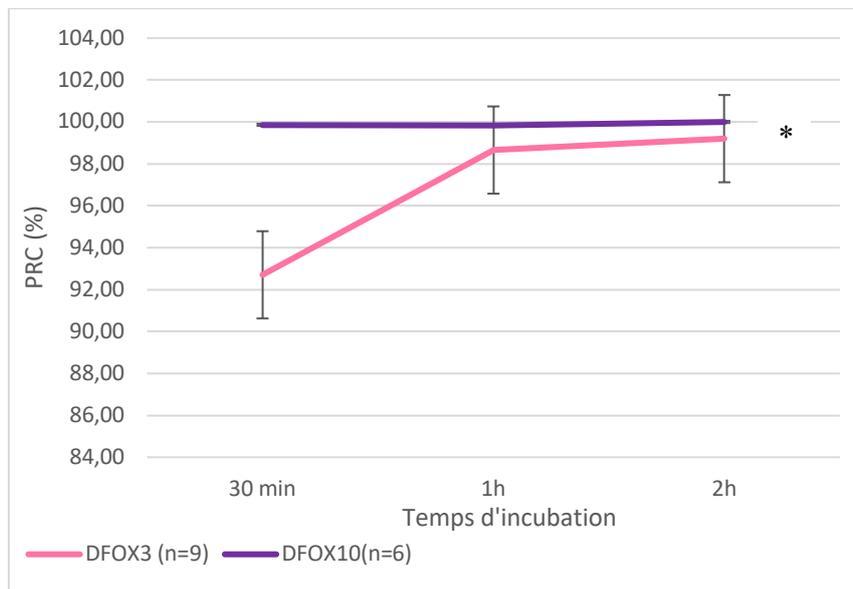


Figure 46 : Évolution de la PRC dans le milieu au cours du temps en fonction des différents ratios de chélation. * : différence significative entre 30min et 2h pour le ratio molaire 1 :3 de DFO

Afin de travailler dans des conditions optimales quel que soit le ratio molaire, nous avons choisi de réaliser les prochains radiomarquages avec **2 heures d'incubation**.

- Choix des ratios molaires de l'Ac versus chélatant et de la quantité d'Ac chélaté

L'influence du ratio molaire du chélatant par rapport à l'Ac (Ac:chélatant) et la quantité d'Ac chélaté sur le rendement de marquage a été étudiée à partir des PRC.

Deux ratios molaire de DFO ont été étudiés, 1:3 et 1:10, et deux quantités d'Ac ont été chélatées, 2mg et 5mg.

Lorsque la chélation a été réalisée avec 5mg d'Ac, les deux ratios molaires testés n'ont montré aucune différence (p compris entre 0,49-0,1). Ils permettaient d'obtenir une excellente PRC (> 95 %).

Néanmoins, la quantité d'Ac chélaté a montré une influence sur le rendement. En effet, pour un même ratio molaire, une différence significative a été observée entre la condition 5mg DFO 1 :3 et 2mg DFO 1 :3 (Mann-Whitney, $p < 0,05$). (Figure 47)

Cette différence n'est pas retrouvée avec le ratio molaire 1:10.

Pour la suite des études, nous avons décidé de travailler avec les conditions suivantes : **5 mg d'Ac avec un ratio de DFO 1:10** (Ac 5mg DFO 1:10) et **5 mg d'Ac avec un ratio de DFO 1:3** (Ac 5mg DFO 1:3), ce qui nous permet d'avoir un stock d'Ac chélaté disponible pour plusieurs radiomarquages. Augmenter la quantité de DFO augmente les rendements mais présente un risque supérieur d'altération de l'affinité de l'Ac donc nous souhaitons tester l'effet de la quantité de DFO sur l'affinité.

Toutefois, si la quantité d'Ac disponible est limitée, nous pourrions être amené à chélater des quantités inférieures d'Ac, mais les résultats montrent qu'il faudra alors conserver un ratio DFO 1:10.

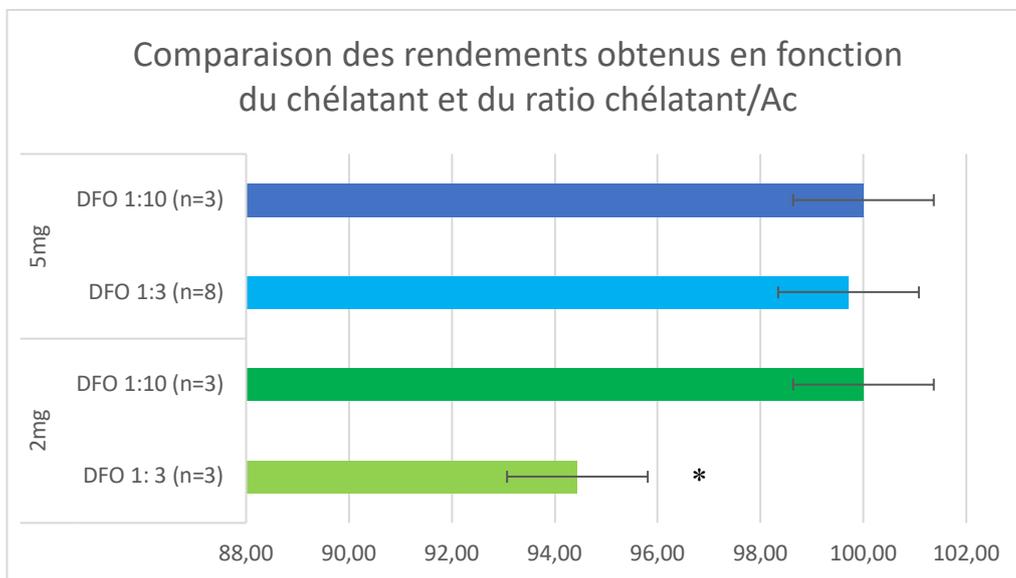


Figure 47 : : Comparaison des rendements obtenus en fonction de la quantité d'Ac chélaté et du ratio chélatant/Ac. Ac : anticorps ; DFO : desferrioxamine, * : différence significative entre la condition 5mg DFO 1 :3 et 2mg DFO 1 :3 ($p < 0,05$)

ii. Radiomarquage de l'Ac chélaté

- Influence de la quantité d'Ac chélaté sur la PRC

Nous avons tout d'abord travaillé avec 0,5mg d'Ac chélaté pour chaque radiomarquage au ^{89}Zr . Néanmoins, les quantités d'Ac disponibles pouvant être limitées, nous avons voulu vérifier que radiomarquer une quantité plus faible d'Ac n'influencerait pas le rendement de marquage. En particulier, l'Ac anti-IL-6mR étant

disponible en faible quantité, nous avons choisi de tester le radiomarquage sur 0,25mg d'Ac.

Il a été noté lors du radiomarquage, de moins de 0,5 mg d'Ac, que **la PRC était significativement plus faible lorsque nous avons utilisé 0,25mg d'Ac** (Mann-Whitney, $p < 0,05$). (Tableau 6)

	Conditions de radiomarquage		PRC (30min PM)	
	Activité spécifique (MBq/mg)	Quantité d'Ac radiomarqués (mg)	Tocilizumab (%) (m+/-s _d)	Pavilizumab (%) (m+/-s _d)
Ratio molaire 1:10	16	0,5	100+/-0 (n=6)	96,45 +/-3,3 (n=2)
		0,25	87,69+/-2,62 (n=2)	89,6 (n=1)
Ratio molaire 1:3		0,5	98,27+/-0,6 (n=11)	98,5+/- 1,22 (n=2)
		0,25	82,67 +/-1,63 (n=2)	82,01 (n=1)

Tableau 6 : Récapitulatif des conditions et PRC du radiomarquage. m : moyenne, sd : écart type, PM : post-marquage, PRC : pureté radiochimique

Les résultats ont donc montré que la PRC pouvait être réduite en fonction de la quantité d'Ac chélaté (2mg DFO 1:3), ou de la quantité d'Ac à radiomarquer (0,25mg). Ceci est très certainement dû à la perte d'Ac lors des étapes de chélation et de radiomarquage qui peuvent diminuer la quantité d'Ac, et donc la PRC.

- Méthode de dosage par HPLC

Pour vérifier cela, nous avons mis au point une méthode de dosage par HPLC afin de suivre la concentration en Ac tout au long de notre méthode de marquage et pour observer l'activité de notre Ac après radiomarquage. (Figure 48)

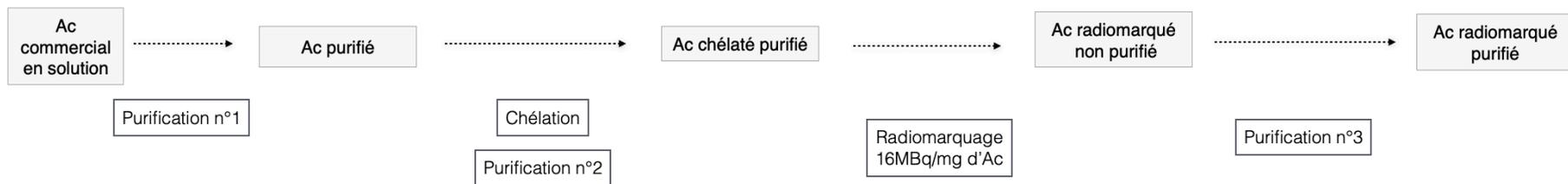
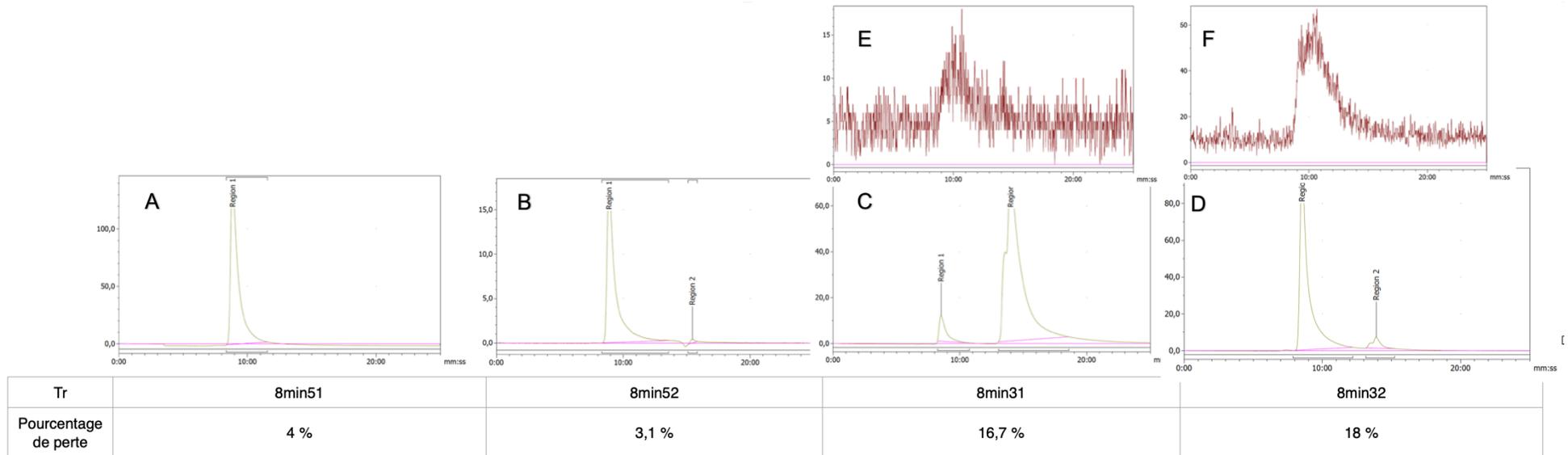


Figure 48 : HPLC à chaque étape du radiomarquage du pavilizumab 5mg DFO x3

Les temps de rétention (T_r) et les illustrations des graphiques HPLC (A, B, C, D : détection UV 230nm ; E, F : détection gamma) correspondant à chaque étape de radiomarquage de l'Ac nécessitant une purification (changement de tampon, chélation et radiomarquage) sont représentés.

Le pourcentage de perte d'Ac est déterminé pour chaque étape de purification. Il correspond au rapport entre la concentration obtenue en Ac après purification et la concentration théorique attendue en Ac.

B : Région 1 = Ac chélaté ; Région 2 = chélatant seul

C : Région 1 = A radiomarqué ; Région 2 = acide oxalique

D : Région 1 = ; Région 2 = acide gentisique 5mg/mL

Nous avons pu observer, lors des différentes étapes de purification, des pertes d'Ac par HPLC à l'aide de la courbe de calibration effectuée avec les solutions commerciales d'Ac. Le pourcentage de perte en Ac le plus important a été retrouvé lors de l'étape de purification après radiomarquage (18%).

Le pourcentage de perte en Ac déterminé par HPLC (Figure 38) était similaire à la perte d'activité mesurée après purification des Ac radiomarqués (entre 15-20% de perte d'activité). (Tableau 7)

	PRC %	Activité avant purification (MBq)	Activité après purification (MBq)	Perte de ⁸⁹ Zr
Pavilizumab ratio molaire 1:10	89,6	1,8	1,56	14 %
Pavilizumab ratio molaire 1:3	82,01	1,64	1,64	0 %
Tocilizumab ratio molaire 1:10	80,36	1,6	1,37	14 %
Tocilizumab ratio molaire 1:3	94,1	1,88	1,31	20 %

Tableau 7 : Perte en activité d'Ac radiomarqués après purification. PRC : Pureté radiochimique

Les étapes de chélation et de marquages entraînent donc des pertes en Ac, ce qui peut expliquer la sensibilité de la PRC à la quantité d'Ac mise en jeu.

Lors du radiomarquage de l'Ac murin, il sera donc nécessaire de réaliser une purification après radiomarquage pour ne pas injecter du ⁸⁹Zr libre chez l'animal.

iii. Influence de l'activité spécifique

Nous avons également étudié la PRC en fonction de l'activité spécifique de marquage de l'Ac chélaté.

Au bout de 30 minutes d'incubation, nous avons observé que l'activité spécifique de marquage de 16MBq/mg permettait d'obtenir une PRC supérieure à celle obtenue avec 32MBq/mg. (*, Mann-Whitney, $p < 0,05$)

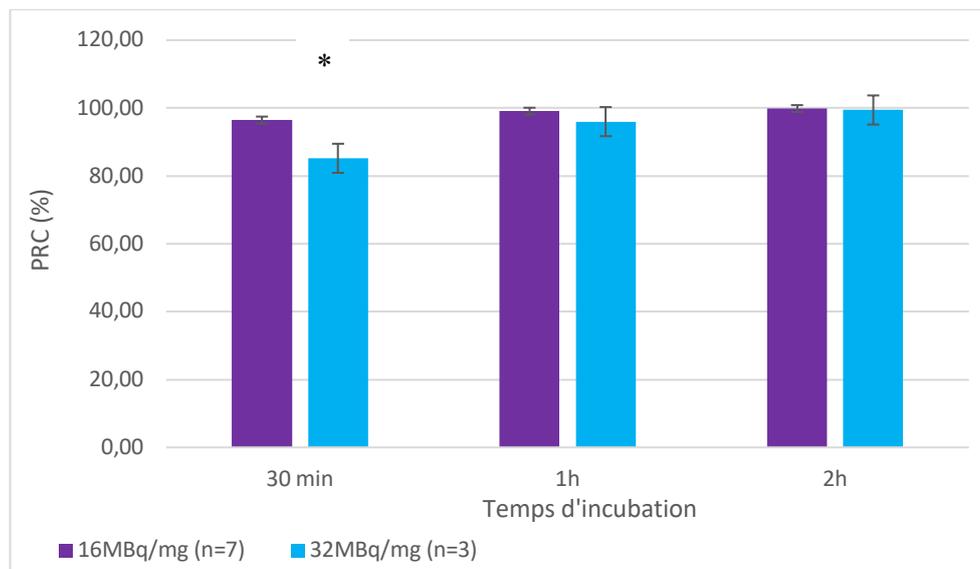


Figure 49 : Influence de l'activité spécifique (16MBq/mg, 32MBq/mg) sur le rendement de marquage d'Ac au ^{89}Zr

Néanmoins, au bout de deux heures d'incubation, cette différence n'est plus retrouvée entre les moyennes des PRC. (Figure 49)

iv. Récapitulatif de l'optimisation du radiomarquage au ⁸⁹Zr

Les expériences ont ainsi été répétées sur le tocilizumab, le pavilizumab et l'atézolizumab. Ce tableau reprend les conditions de chélation et de marquage retenues, associées aux PRC obtenues. Notre méthode a permis d'obtenir une PRC > 80%. (Tableau 8)

	Conditions de chélation		Conditions de radiomarquage		PRC T _{30min} post marquage (%) (m+/- s _d)	PRC T _{2h} post marquage (%) (m+/- s _d)	Effectif
	Ratio molaire	Ac (mg)	Quantité d'Ac (mg)	Activité spécifique (MBq/mg)			
Tocilizumab	1:3	5	0,5	16	95,35 +/- 7,62	99,71 +/- 0,60	n=8
	1:10	2			100 +/- 0,00	100 +/- 0,00	n=3
		5			99,67 +/- 0,58	100 +/- 0,00	n=3
Pavilizumab	1:3	5	0,5	16	-	96,45 +/-3,3	n=2
		5	0,25	16	-	89,6	n=1
	1:10	5	0,5	16	-	98,5+/- 1,22	n=2
		5	0,25	16	-	82,01	n=1
Atézolizumab	1:3	5	0,5	16	-	100+/-0,8	n=3

Tableau 8 : Récapitulatif de l'optimisation du radiomarquage au ⁸⁹Zr. Ac : anticorps, PRC : Pureté radiochimique, m : moyenne, s_d : écart-type

b. Mise au point du radiomarquage au ^{64}Cu

i. Choix des conditions d'incubation et de chélation

Les tests ont été réalisés sur le même Ac, ici l'atézolizumab, à un ratio molaire de 1:20 de chélatants (DOTA-SCN, NOTA-SCN, DOTA-NHS), afin de pouvoir comparer par la suite les conditions entre elles.

Nous avons tout d'abord étudié l'influence du temps et de la température lors de l'étape de chélation des Ac sur le rendement final de marquage au ^{64}Cu avec les 3 chélatants. Deux conditions sont testées lors de l'incubation de l'Ac avec le chélatant :

- Soit à température ambiante toute la nuit (overnight-room temperature : ON-RT).
- Soit pendant 6h à 40°C.

Pour le DOTA-SCN, 30 minutes après le radiomarquage, la PRC correspondant à la condition d'incubation ON RT était égale à 76,6% versus 94,3% à 6h-40°C. Néanmoins, 2 heures après le radiomarquage cette différence n'était plus retrouvée.

Le NOTA a permis d'obtenir une très bonne PRC dès 30 minutes d'incubation quelle que soit la condition.

Le DOTA-NHS montrait, quant à lui, une PRC bien inférieure aux deux autres chélatants, qui ne s'était pas améliorée avec l'incubation (Figure 50).

Devant ces résultats, afin de réaliser des chélation sur un temps plus restreint nous avons choisi la **condition de chélation 6h-40°C**.

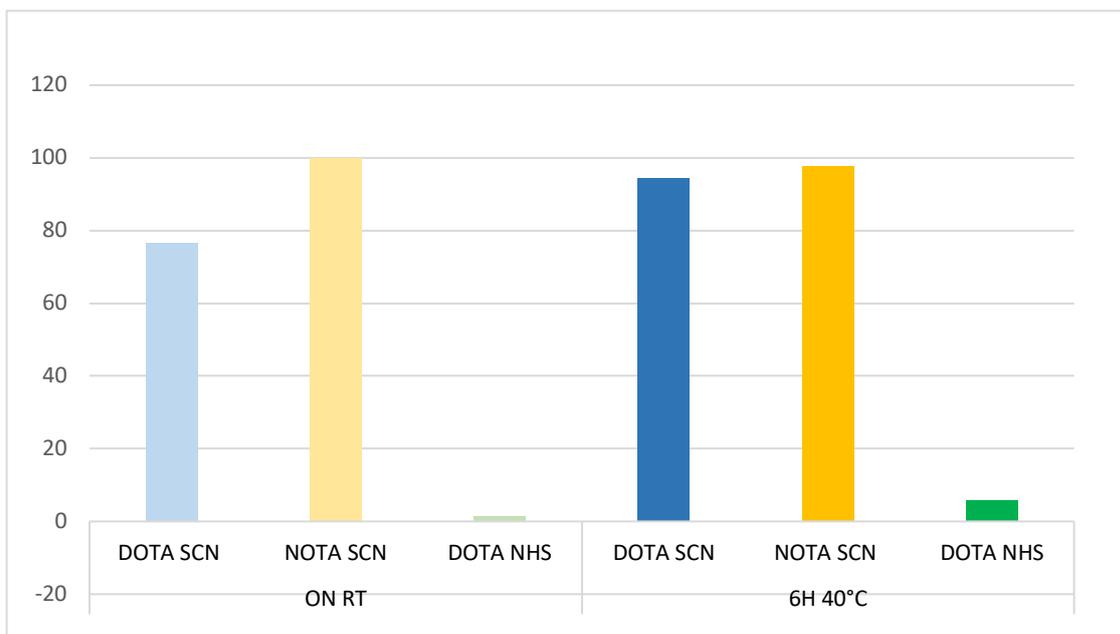


Figure 50 : PRC obtenues en fonction du temps et de la température d'incubation des chélatants (ratio molaire 1:20) à 30min post-marquage au ^{64}Cu . PRC : Pureté Radiochimique ; ON RT : Overnight Room Temperature

Devant ces résultats, nous avons choisi de tester différents ratios molaires pour les prochaines expériences :

- Pour le **DOTA-SCN**, sa PRC étant très bonne, mais possiblement influencée par d'autres facteurs (comme le temps et la température d'incubation), nous avons choisi de conserver le **ratio molaire 1:20**, et de tester un ratio plus important, **1:40**, pour améliorer la PRC.
- Pour le **NOTA-SCN**, sa PRC étant excellente, nous avons choisi de conserver le **ratio molaire 1:20** et de tester un ratio plus petit, **1:10**, afin de limiter l'encombrement stérique de l'Ac.
- Pour le **DOTA-NHS**, sa PRC étant médiocre, nous avons choisi de conserver le **ratio molaire 1:20**, afin d'avoir un contrôle, et de tester un ratio plus important, **1:40**, pour améliorer la PRC.

ii. Choix du chélatant et du ratio molaire

Nous avons réalisé plusieurs marquages, en faisant varier la nature des chélatants (DOTA-SCN, NOTA-SCN, DOTA-NHS) et leurs ratios molaires, afin de choisir le chélatant le plus adapté à notre méthode.

Avant de comparer les chélatants entre eux, nous avons voulu tout d'abord déterminer les conditions optimales de marquage. Nous avons donc étudié l'évolution de la PRC de chaque chélatant au cours du temps d'incubation avec le ^{64}Cu , à une activité spécifique de 200MBq/mg d'Ac (Figure 51).

Entre 30 minutes et 2 heures d'incubation de l'Ac radiomarqué, seul l'Ac fonctionnalisé par le NOTA 1:10 a montré une amélioration significative de sa PRC durant les 2 heures d'incubation. (*, $p < 0,001$).

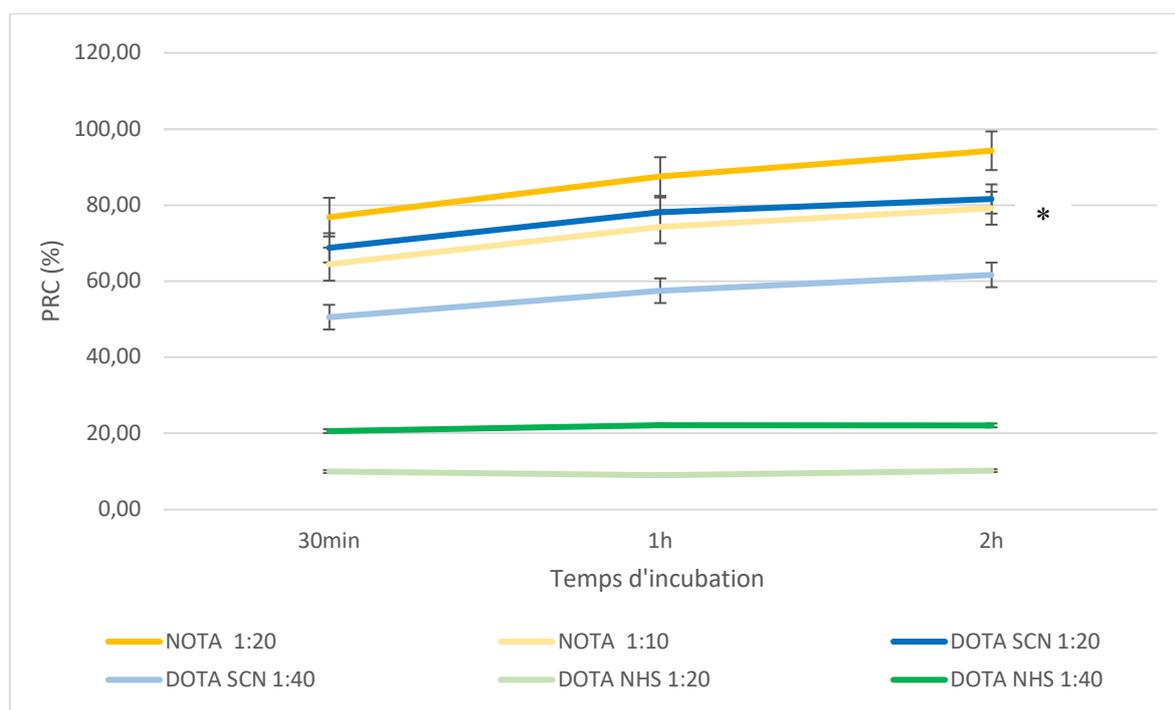


Figure 51: Évolution de la PRC des Ac radiomarqués au ^{64}Cu dans le milieu au cours du temps en fonction des différents chélatants (DOTA NHS, DOTA SCN, NOTA SCN). *: différence significative ($p < 0,001$) entre 30min et 2h d'incubation pour le ratio molaire 1:10 du NOTA SCN

Nous choisirons donc par la suite de réaliser toutes les **incubations de l'Ac avec le ^{64}Cu durant 2 heures.**

Nous avons ensuite comparé les chélatants entre eux. Tous les résultats de radiomarquage avec l'atézolizumab et le tocilizumab ont été poolés car leur structure a été considérée comme proche (IgG1).

Au bout de deux heures de chélation, pour chaque chélatant analysé séparément, les ratios molaires n'ont montré aucune influence sur la PRC. ($p > 0,8$)

Pour le NOTA SCN, nous pouvons donc en conclure que le ratio 1:10 permettait d'obtenir une PRC optimale pour un encombrement stérique plus faible.

Pour le DOTA SCN, l'augmentation du ratio molaire n'est pas utile pour optimiser le radiomarquage.

Pour le DOTA NHS, l'augmentation du ratio molaire a permis d'améliorer la PRC. (*, Mann-Whitney, $p < 0,05$)

Toutefois, les différents chélatants n'ont pas donné de PRC similaires.

En effet, malgré l'augmentation du ratio à 1:40, la PRC du DOTA NHS est significativement inférieure à celle du DOTA SCN et du NOTA SCN (**, Mann-Whitney, $p < 0,05$). (Figure 52)

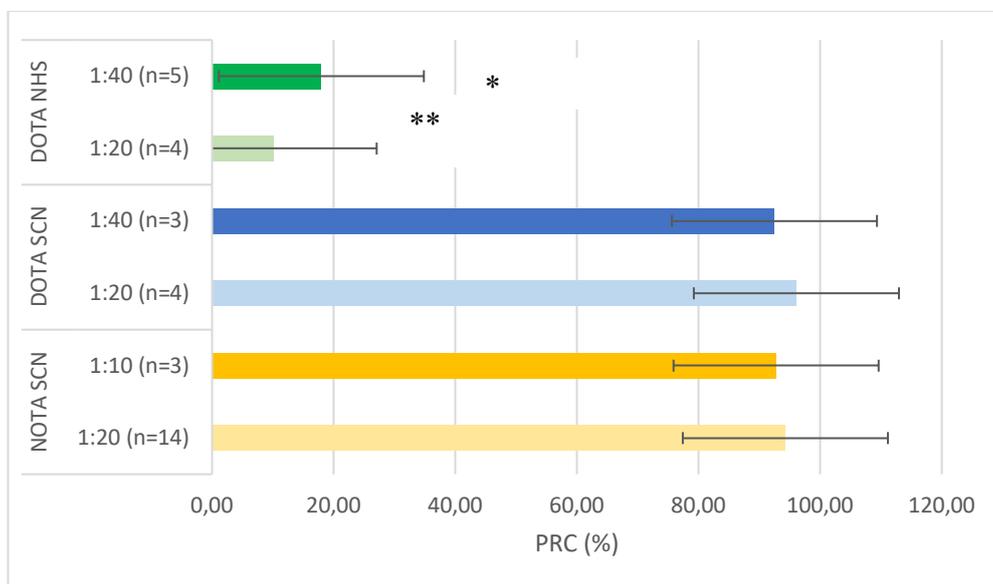


Figure 52 : PRC obtenues en fonction du ratio molaire des chélatants après 2h d'incubation d'Ac chélatés (DOTA-NHS, DOTA-SCN, NOTA-SCN) et radiomarqués au ^{64}Cu . *: différence significative entre le DOTA NHS (ratio molaire 1 :20) et les deux autres chélatants (1 :20)

iii. Influence de l'activité spécifique et de la décroissance du ^{64}Cu

L'influence de l'activité spécifique a été étudiée en radiomarquant l'Ac par 200MBq/mg ou 100MBq/mg.

Pour le NOTA SCN et le DOTA NHS, l'activité spécifique n'influçait pas la PRC. Néanmoins, sur la figure ci-dessous (Figure 53), le DOTA SCN présente une PRC significativement plus faible avec 100MBq/mg par rapport à 200MBq/mg. (*, Mann Whitney, $p < 0,05$).

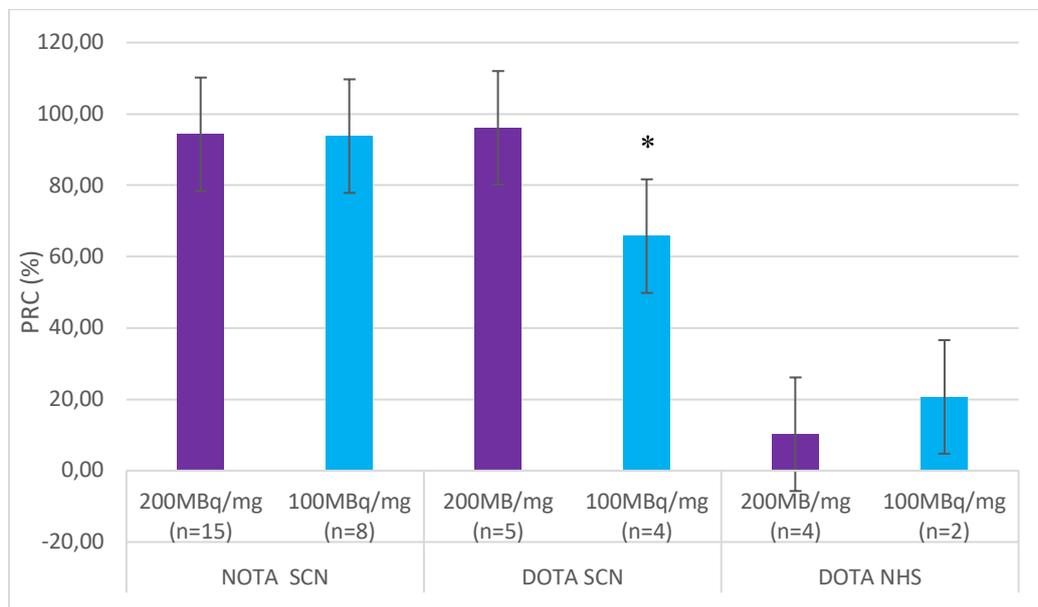


Figure 53 : Influence de l'activité spécifique (200MBq/mg et 100MBq/mg) sur le rendement de marquage d'Ac au ^{64}Cu en fonction du chélatant de ratio molaire 1:20

Nous avons répété cette étude pour chaque ratio molaire, et nous avons obtenu les mêmes résultats que précédemment. C'est-à-dire que nous avons observé seulement une différence de PRC pour le DOTA SCN. (Mann Whitney, $p < 0,05$) (Figure 55)

Sachant que tous les marquages n'ont pas été réalisés le même jour, nous avons voulu vérifier si le délai entre la livraison et le marquage pouvait expliquer ces résultats.

Nous avons alors comparé le rendement obtenu lorsque le marquage a été effectué le jour même de livraison et à J+1 afin d'étudier l'éventuel impact des produits de décroissances du ^{64}Cu sur le rendement de marquage. Aucune différence significative n'a été retrouvée entre les moyennes ($n=3$) de rendement en fonction du jour de marquage (Mann-Whitney, $p=0,7$)

iv. Récapitulatif de l'optimisation du radiomarquage au ⁶⁴Cu

Les expériences ont ainsi été répétées, sur le tocilizumab et l'atézolizumab. Elles ont confirmé qu'elles permettaient d'obtenir une très bonne PRC (> 90%) en fonction des conditions testées. (Tableau 9)

	Condition de chélation		Condition de radiomarquage		PRC t _{30min} post marquage (%) (m+/-s _d)	PRC t _{2h} post marquage (%) (m+/-s _d)	Effectif Total (n)	Atézolizumab (n)	Tocilizumab (n)
	Quantité d'anticorps (mg)	Ratio molaire	Quantité d'anticorps (mg)	Activité spécifique (MBq/mg)					
DOTA SCN	5	1:20	0,25	200	81,57+/-16,06	96,09+/-5,33	5	3	2
				100	44,01+/-8,57	69,17+/-23,35	3	3	-
		1:40	0,25	200	75,82+/-23,09	92,48+/-4,36	3	3	-
				100	30,16+/-27,16	50,68+/-47,00	3	3	-
NOTA SCN	5	1:20	0,25	200	80,36+/-15,54	94,38+/-7,04	15	8	7
				100	79,9+/-17,78	92,93+/-7,03	8	5	3
		1:10	0,25	200	77,87+/-20,9	92,75+/-10,36	3	1	2
				100	74,69+/-18,54	95,38+/-0,86	3	3	-
DOTA NHS	5	1:20	0,25	200	9,97+/-14,08	10,21+/-14,50	4	1	3
				100	16,52+/-22,87	10,67+/-28,65	2	1	1
		1:40	0,25	200	20,6+/-34,89	17,97+/-36,89	5	3	2
				100	28,86+/-49,98	29,96+/-51,89	2	1	1

Tableau 9 : Récapitulatif de l'optimisation du radiomarquage au ⁶⁴Cu. Ac : anticorps, PRC : Pureté radiochimique, m : moyenne, s_d : écart-type.

2. Étude *in vitro*

a. Étude de stabilité

L'étude de stabilité des Ac radiomarqués au ^{89}Zr et au ^{64}Cu a montré une bonne stabilité de la liaison. Le calcul de la PRC a permis de suivre la variation de radionucléide libre sur la période choisie, dans 3 milieux différents : le milieu réactionnel, le sérum et le NaCl.

i. Stabilité de l'Ac radiomarqué au ^{89}Zr

La stabilité de l'Ac radiomarqué au ^{89}Zr a été étudiée sur 5 jours avec le tocilizumab (DFO 1:3).

Après incubation dans le milieu réactionnel, dans le sérum et dans le NaCl à température ambiante, la PRC est comprise entre 98 et 99% de J0 à J5 pour le radiomarquage au ^{89}Zr . (Tableau 10)

	Variation de la PRC (Jx/J0) ($m \pm s_D$)		
	Milieu réactionnel (n=3)	Sérum (n=3)	NaCl 0,9% (n=3)
J1	1,01 \pm 0,008	0,97 \pm 0,014	0,97 \pm 0,013
J3	1,00 \pm 0,004	0,97 \pm 0,033	0,97 \pm 0,014
J5	1,90 \pm 0,004	1,23 \pm 0,35	1,00 \pm 0,004

Tableau 10 : Stabilité de radiomarquage en fonction des différentes conditions de chélation : Suivi de la variation de la PRC des ^{89}Zr -DFO-Ac à J1, J3 et J5 par rapport à J0

Les études de stabilité sur le ratio molaire DFO 1:10 dans les 3 milieux ont montré des résultats similaires.

ii. Stabilité de l'Ac radiomarqué au ⁶⁴Cu

La stabilité de l'Ac radiomarqué au ⁶⁴Cu a été étudiée sur 2 jours avec le tocilizumab (NOTA 1:10).

Pour le radiomarquage au ⁶⁴Cu, après incubation dans les différents milieux, aucune variation n'a été observée durant les 2 jours, la PRC était comprise entre 90% et 98% à J2. (Tableau 11)

	Variation de la PRC (Jx/J0) (m±sD)		
	Milieu réactionnel (n=4)	Sérum (n=4)	NaCl 0,9% (n=4)
J1	1,15±0,08	1,13±0,08	1,13±0,08
J2	1,15±0,08	1,11±0,10	1,13±0,07

Tableau 11 : Stabilité de radiomarquage en fonction des différentes conditions de chélation : Suivi de la variation de la PRC des ⁶⁴Cu-NOTA-Ac à J1 et J2 par rapport à J0.

Les études de stabilité avec le DOTA SCN ont montré des résultats similaires.

b. Étude d'affinité

Il a tout d'abord été choisi de réaliser l'étude d'affinité pour les Ac radiomarqués au ⁸⁹Zr. Lors de cette étude, il a été analysé dans un premier temps l'expression antigénique de l'IL-6R pour le tocilizumab et du PD-L1 pour l'atézolizumab par analyse FACS sur les cellules U266 et MDA-MB231. Nous avons également étudié s'il était possible d'induire l'expression de l'IL-6R et du PD-L1 par TNF et IFN.

Suite à cette étude, l'optimisation des tests d'affinité et d'immunoréactivité du tocilizumab a été réalisée sur cellules. En raison du nombre de cellules disponibles, les tests d'affinité pour l'atézolizumab n'ont été réalisés que sur Ag PD-L1 coatés sur plaque.

i. FACS

L'étude de l'expression de PD-L1 et de l'IL-6R sur les cellules MDA-MB231 ont montré une forte expression vis-à-vis de PD-L1 et une expression plus modérée mais correcte de l'IL-6R par rapport au contrôle. (Figure 55)

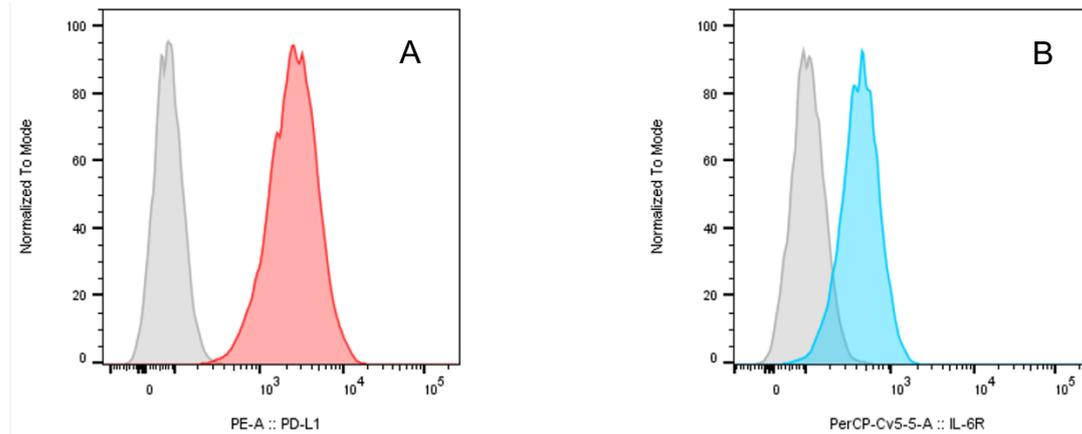


Figure 54 : Profil FACS de l'expression de PD-L1 (A) et IL-6R (B) des MDA-MB231. PD-L1 couplé au PE-A (rouge), IL-6R couplé au PerCP-Cv5-5-A (bleu), contrôle (gris)

Aucune induction, de l'expression de PD-L1 ou de l'IL-6R, par TNF ou IFN n'a été observée sur les deux lignées cellulaires.

Il est à noter que suite à cette étude par FACS il a été choisi d'écarter les cellules U266 des études de binding et d'immunoréactivité, en raison de leur faible expression antigénique d'IL-6R et de PD-L1.

ii. Étude de binding et détermination du K_d

- Binding sur cellules : étude de l'affinité du tocilizumab- ^{89}Zr

La représentation de ces résultats par la méthode de Scatchard, c'est-à-dire le rapport de la liaison spécifique sur la concentration en Ac libre en fonction de la liaison spécifique ($BS/F=f(BS)$), a permis de déterminer la constante d'affinité K_D qui égale à 7,53nM. (Figure 56)

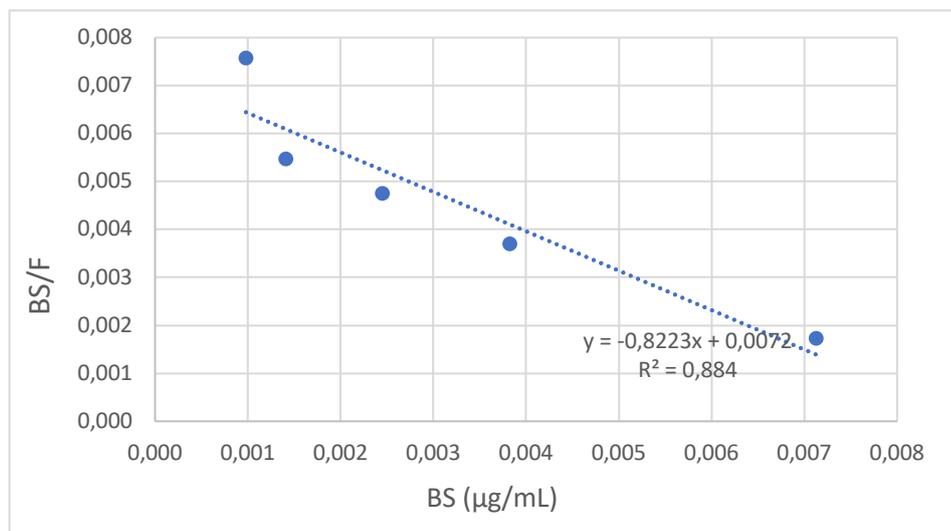


Figure 55 : Détermination de l'immunoaffinité du tocilizumab radiomarqué sur cellules MDA-MB231

LT : Liaison totale, LNS : Liaison non spécifique, LS : Liaison spécifique, B : concentration Ac lié, Ac : concentration totale en Ac ajoutés, BS : concentration d'Ac intervenant dans la liaison spécifique, F : concentration en Ac libre

- Binding sur Ag : étude de l'affinité de l'atézolizumab- ^{89}Zr

Il a été observé que plus la concentration en cellules augmente, c'est-à-dire la concentration en Ag, plus la fixation totale augmente. De plus, la liaison spécifique, calculée à partir de la liaison non spécifique obtenue par le déplacement avec du tocilizumab non radiomarqué, augmente de façon parallèle. La liaison spécifique est supérieure à la liaison non spécifique, toutefois cette dernière reste importante. (Figure 57)

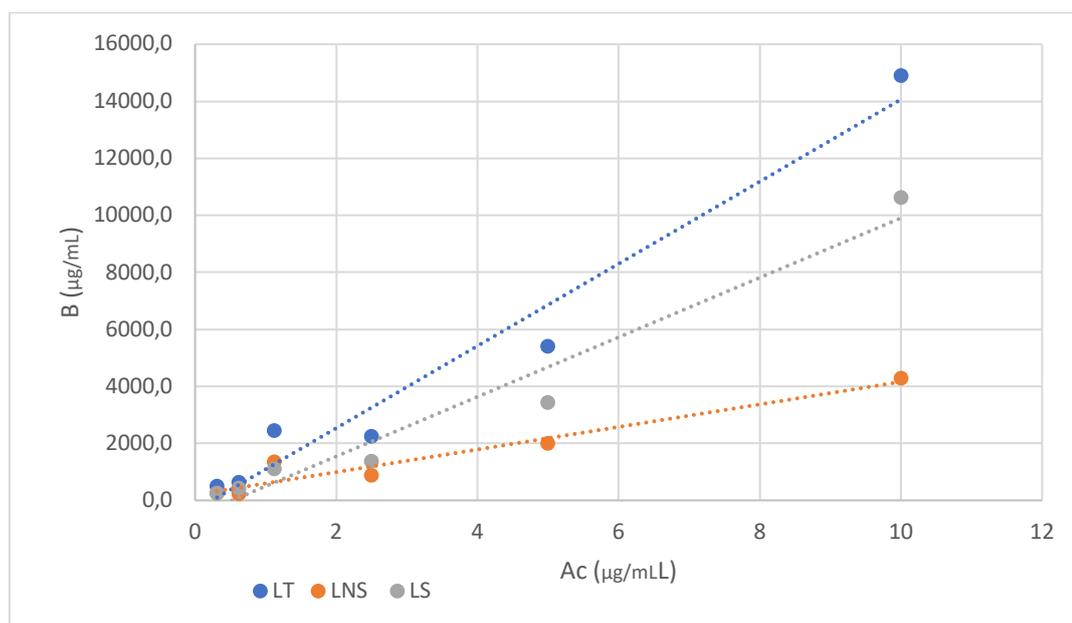


Figure 56 : Détermination de l'immunoaffinité de l'atézolizumab radiomarqué sur Ag coatés PD-L1.
 LT : Liaison totale, LNS : Liaison non spécifique, LS : Liaison spécifique, B : concentration Ac lié, Ac : concentration totale en Ac ajoutés

Néanmoins, l'optimisation de l'étude de binding sur Ag coatés sur plaque de l'atézolizumab n'a permis de réaliser la représentation de Scatchard afin déterminer la constante de dissociation, malgré une liaison spécifique supérieure à la liaison non spécifique.

iii. Détermination de la fraction immuno-réactive IRF

L'immunoréactivité du ^{89}Zr -Tocilizumab est représentée selon la méthode de Lineweaver-Burk avec le rapport de la liaison totale sur la liaison spécifique en fonction de l'inverse du nombre de cellules. La droite de régression linéaire montre une fraction immunoréactive autour de 50%. (Figure 58)

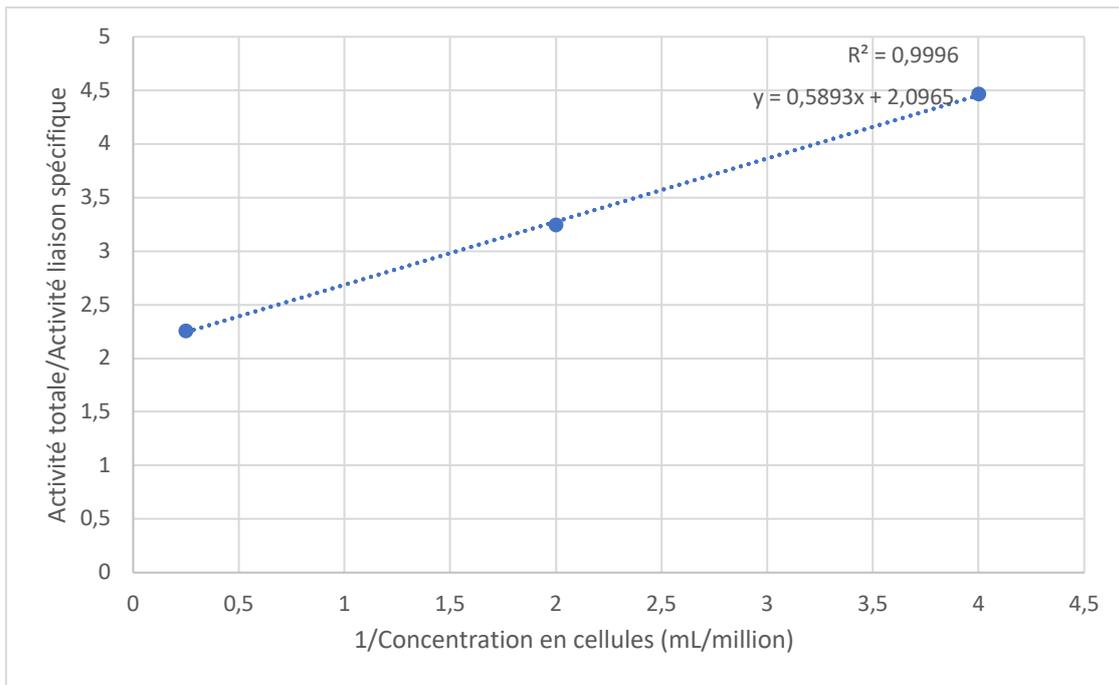


Figure 57 : Détermination de l'immunoréactivité du tocilizumab radiomarqué sur cellules MDA-MB231

3. Étude *in vivo*

a. Mise en place du modèle

Avant l'injection du ^{18}F -FDG, à J56 post-immunisation, le score arthritique de chaque patte des souris a été déterminé par évaluation clinique. (Figure 59) Les souris SHAM (n=2) ne présentaient aucune lésion. Les souris malades (n=6) présentaient des scores totaux variant de 4 à 13 (sur 16) établis selon l'aspect de leurs pattes.

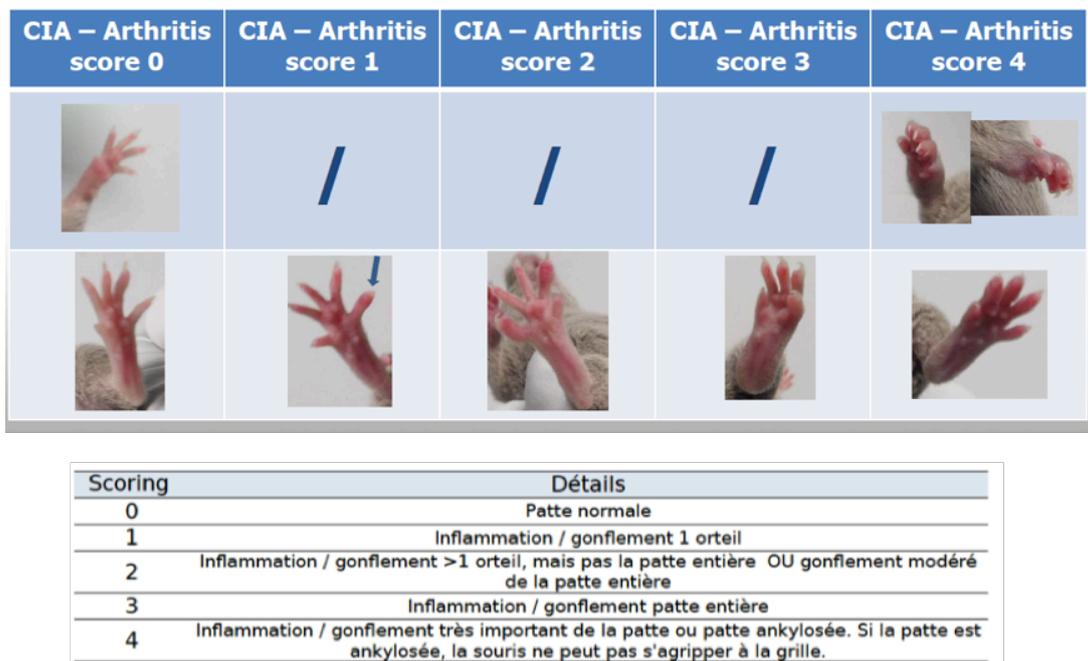


Figure 58 : Quotation du score arthritique par patte des lésions arthritiques distales (IMAVITA).
CIA : Collagen Induced Arthritis

b. Imagerie au ^{18}F -FDG du modèle murin de PR

Au niveau des articulations proximales, une fixation plus intense a été observée chez les souris malade CIA par rapport aux souris SHAM. (Figure 60)

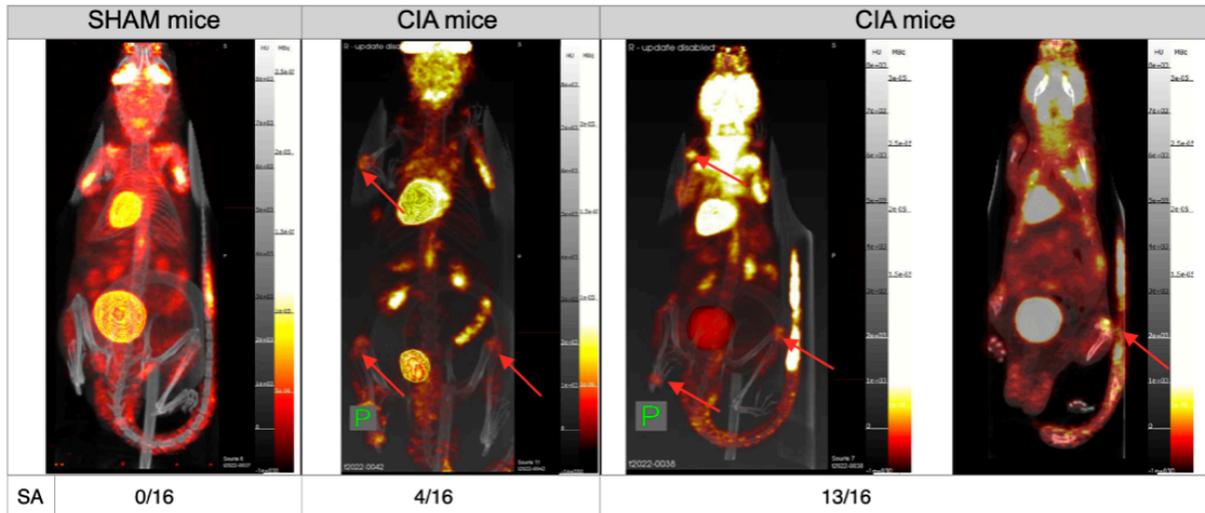


Figure 59 : Étude de la fixation entre les souris malades (CIA mice) et la souris contrôle (SHAM).
SA : Score arthritique

L'intensité de fixation du ^{18}F -FDG représentée par le *volume of interest* (VOI) au niveau des articulations distales et du cœur de chaque souris a été mesurée. Un rapport entre le VOI de chaque articulation sur le VOI du cœur a été réalisée afin de normaliser la mesure. (Tableau 12) Toutefois, aucune corrélation n'a été démontrée entre l'intensité de fixation des articulations distales et le score clinique ($r=0,57$).

	Score/Articulation	Articulation VOI fixation/ Heart VOI Fixation ($m \pm s_D$)
CIA mice	0 (n=7)	0,87 \pm 0,2
	1 (n=3)	0,87 \pm 0,0
	2 (n=3)	1,08 \pm 0,2
	3 (n=3)	0,92 \pm 0,1
	4 (n=8)	1,16 \pm 0,4
Control mice	0 (n=8)	1,15 \pm 0,2

Tableau 12 : Moyennes et écart-types de la fixation du ^{18}F -FDG en fonction du score arthritique des souris CIA et des souris contrôles.

c. Évaluation de la biodistribution par imagerie TEP

Pour les deux Ac, anti-IL-6R et témoin, une activité d'environ 0,3 à 0,4 MBq a été injectée par souris en IV. La PRC obtenue après radiomarquage au ^{89}Zr de l'Ac anti-IL-6mR était plus faible que celle des mises au point avec le tocilizumab et le pavilizumab (entre 70 et 80%) et a nécessité une purification avant injection.

L'acquisition TEP a été réalisée pendant 30 à 40 minutes à J0, J1, J3 et J5, et elle a été suivie ou précédée d'une acquisition CT de 6 minutes.

Les souris SHAM (n=2) se sont vues injecter soit l'Ac contrôle, soit l'Ac anti-IL-6R. Pour les souris CIA (n=6), 3 souris ont reçu l'Ac anti-IL-6R, et 3 souris ont reçu l'Ac témoin en intraveineux.

Après injection de ^{89}Zr -anti-IL6mR, dès J1 post-injection, les souris CIA ont présenté une fixation au niveau des pattes, contrairement au souris SHAM. (Figure 61)

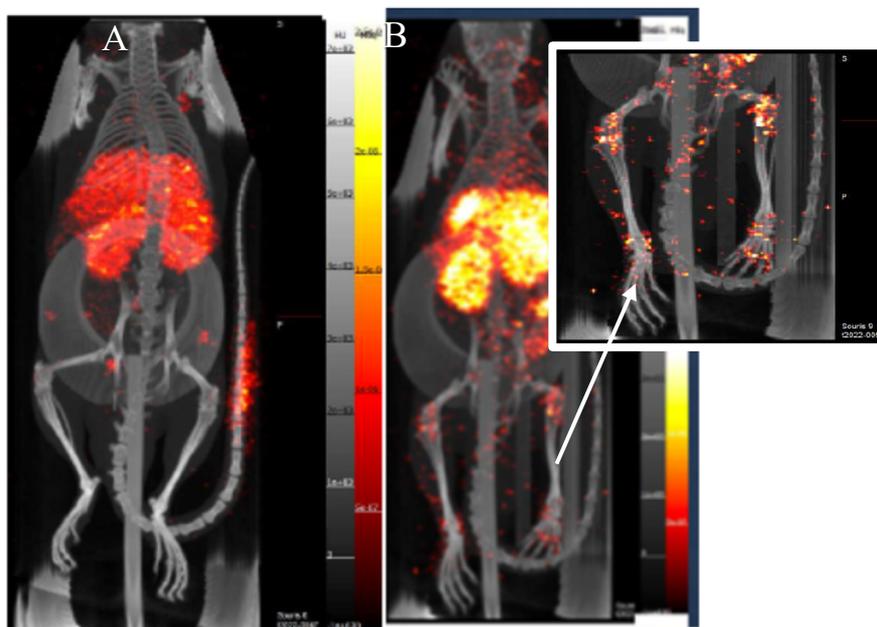


Figure 60 : Étude de la fixation du ^{89}Zr -Ac anti-IL6R chez la souris SHAM (A) et CIA (B) à J1 post injection. CIA : Collagen Induced Arthritis ; Score arthritique de la souris CIA : 11/16

A la fois chez les souris CIA et les souris SHAM, une fixation importante a été observée au niveau des tissus réticulés (néphron, foie, moelle, rate), et celle-ci persistait jusqu'à J5. Dans les reins, cette fixation était plus particulièrement importante au niveau cortical.

(Figure 62)

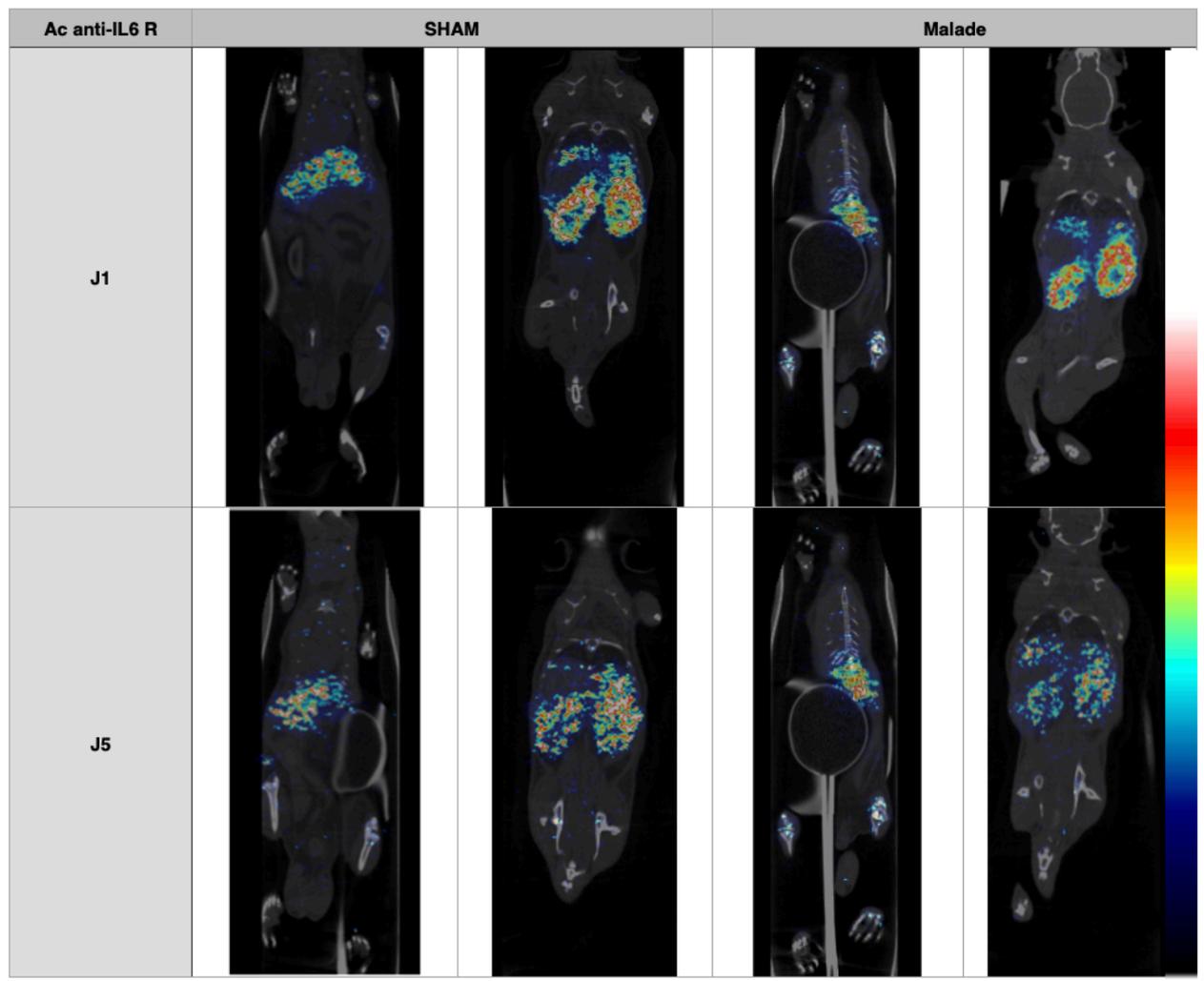


Figure 61 : Imagerie TEP à J1 et J5 de l'Ac anti récepteur murin à l'IL6 radiomarqué au ^{89}Zr chez une souris SHAM (souris n°6) et une souris malade (souris n°8). Injection de 0,3 à 0,5MBq chez une souris SHAM et CIA de ^{89}Zr -antiIL6mR. Imagerie à J1 et J5 avec une acquisition de 30 à 40min.

Après injection de l'Ac contrôle (^{89}Zr -palivizumab), de la même manière qu'avec le ^{89}Zr -anti-IL6mR, une fixation a été observée au niveau des pattes chez les souris CIA contrairement aux souris SHAM. Cette fixation se situait plus précisément au niveau du tissu enflammé. (Figure 63)

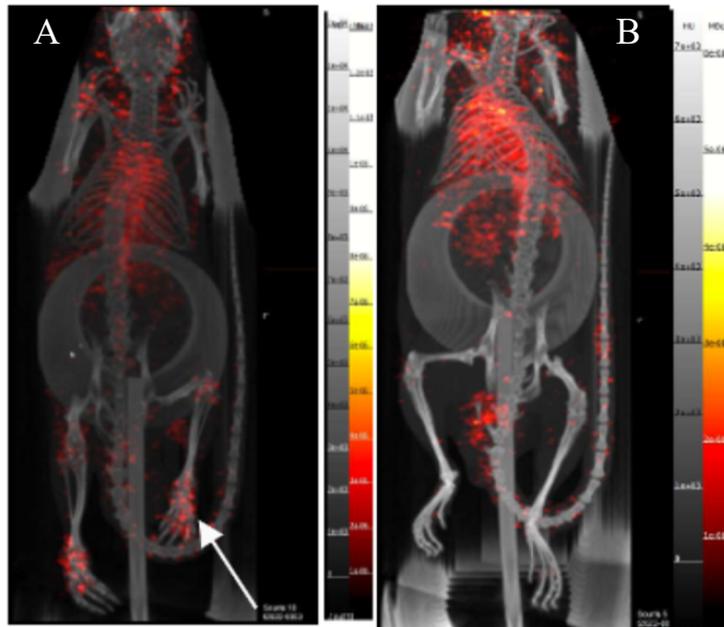


Figure 62 : Étude de la fixation du ^{89}Zr -Ac témoin chez la souris CIA (A) et SHAM (B) à J1 post injection. CIA : Collagen Induced Arthritis ; Score arthritique de la souris CIA : 13/16 ; flèche blanche : fixation au niveau de distale de la patte

Il a été observé pour les 2 Ac, et plus particulièrement pour l'Ac contrôle, une faible fixation au niveau des épiphyses osseuses (genou, vertèbres) compatible avec la libération de ^{89}Zr .

IV. Discussion

L'objectif de ce travail était de **mettre au point le radiomarquage d'Ac monoclonaux au ^{89}Zr et au ^{64}Cu , et en particulier le tocilizumab et l'atézolizumab, en vue de disposer d'outils utilisables en immunoTEP.**

La première étape de ce travail a été d'élaborer et d'optimiser les conditions de radiomarquage des Ac.

Concernant le ^{89}Zr , le chélatant choisi était la DFO car il est apparu, dans la littérature, comme le chélatant de choix pour le zirconium.

Après avoir testé 2 milieux réactionnels, selon le protocole de Vosjan *et al* et le protocole de Sharma *et al*. Nous avons pu constater que le milieu réactionnel 2, de Sharma *et al*, permettait d'obtenir de meilleurs rendements de radiomarquage. Le facteur important dans ce changement est notamment l'utilisation de réactifs métal free. En effet, les traces de métaux présents dans les réactifs sont susceptibles d'entrer en compétition avec le zirconium et conduisent donc à des diminutions de rendements de marquage.

Afin d'optimiser les rendements de radiomarquage, nous avons également fait varier le ratio molaire (1:3 et 1:10) du DFO vs Ac. Les deux conditions ont permis d'obtenir de bonnes PRC (>80%) avec un avantage pour le DFO 1 :10 en particulier lorsqu'on veut travailler sur de faibles quantités d'Ac. Toutefois, l'augmentation de la quantité de DFO, en augmentant la quantité de chélates fixés par Ac, risque de diminuer l'affinité de l'Ac pour sa cible. Nous avons donc choisi de garder ces deux conditions, afin d'étudier par la suite l'immunoréactivité et de ne pas augmenter davantage le ratio molaire. Afin de connaître exactement le nombre moyen de DFO fixé par Ac après incubation avec les différents ratios, il pourrait être intéressant d'utiliser une technique secondaire de détermination de ce nombre. Pour cela, une dilution isotopique radiométrique similaire à celle effectuée par Anderson *et al*. 1992 pourrait être réalisée. A noter, que dans l'étude de Sharma *et al*, le nombre de chélates par Ac mesuré pour le ratio 1:10 est de 2.6 ± 0.6 et pour un ratio de 1 :5, il est de 1.4 ± 0.5 .

Au total, nous avons réussi à mettre au point des conditions de marquage reproductible, permettant d'obtenir de bonnes PRC pour les deux ratios molaires, 1:3 et 1:10. L'incubation pendant 2h dans le milieu de Sharma *et al* s'est révélée être la méthode optimale pour le radiomarquage au ^{89}Zr .

Concernant le ^{64}Cu , différents chélatants ont été testés. En effet, lors de la revue de la littérature, nous avons noté que le DOTA-NHS et le DOTA-SCN sont des chélatants reconnus pour le cuivre mais que son successeur, le NOTA-SCN, permettait d'améliorer le rendement de marquage et la stabilité. Le NOTA et le DOTA greffés SCN ont permis d'obtenir de bonnes PRC. Nous avons néanmoins noté une légère supériorité de la PRC avec le NOTA par rapport au DOTA-SCN, ce qui est pourrait être expliqué par la taille et la denticité de la cage qui convient mieux à la chélation du cuivre.^{122,126}

Le DOTA-NHS a montré un rendement bien inférieur contrairement à l'étude de Navarro *et al* qui a montré une PRC de 76,5 +/- 2,5% pour le DOTA-NHS (ratio molaire 1:20) et de 58,3 +/- 4,5% pour le NOTA-SCN (ratio molaire 1:20).¹²⁶

L'hypothèse principale serait que son suffixe -NHS nécessiterait d'autres conditions que celles que nous avons utilisées, particulièrement au niveau du pH, pour une fixation optimale du chélate à l'Ac.

Afin d'étudier la fixation du chélate avec l'Ac, nous avons essayé de mettre au point une méthode dosage du nombre de chélatant par Ac par une méthode spectrophotométrique en UV/visible de Brady *et al*.¹²⁷ Néanmoins la mise au point n'a pas été concluante. Il serait nécessaire de continuer ces expériences afin de déterminer ce critère qui serait intéressant pour mieux caractériser l'Ac radiomarké. D'autres méthodes plus robustes peuvent être utilisées pour évaluer le ratio molaire, telles que la spectrométrie de masse.¹²⁸

En conclusion, l'optimisation de la fonctionnalisation des Ac avec le NOTA-SCN et le DOTA-SCN et du marquage au ^{64}Cu nous a permis d'obtenir de bons rendements et une bonne répétabilité.

Lors de l'étude de la stabilité des Ac dans leur milieu réactionnel, du sérum humain et du NaCl, nous avons observé une liaison stable du ^{89}Zr jusqu'à J5 et du ^{64}Cu sur l'Ac jusqu'à J2. Nos résultats sont en accord avec l'étude portant sur le radiomarkage du DFO-trastuzumab par le ^{89}Zr ¹²⁹ : la PRC de l'Ac radiomarké incubé dans du sérum humain à 37°C pendant 7 jours est supérieure à 98%. De même, dans l'étude d'Aghevlian *et al*, sur le marquage d'Ac par du NOTA- ^{64}Cu , aucun relargage de radioactivité après 48h d'incubation *in vitro* dans du sérum à 37°C n'a été observé.

Nous devons également réaliser d'autres tests afin d'étudier la stabilité de la fixation, comme des études de transchélation et transmétallation. L'étude de transchélation

peut être menée en ajoutant de l'EDTA à la solution contenant l'Ac radiomarqué. La transmétallation peut être testée en incubant une solution de Fe^{3+} . Le fer étant retrouvé dans l'organisme, cette étude pourrait permettre de prédire sa stabilité *in vivo*.

Les études d'immunoaffinité n'ont pour le moment pas donné de résultats concluants pour le tocilizumab marqué au ^{89}Zr . Le K_D obtenu de 7,53 nM pour le tocilizumab radiomarqué au ^{89}Zr est sensiblement du même ordre de grandeur que le K_D retrouvée dans la littérature (2,5 nM)¹³⁰ et dans le *approval package* du médicament (10 nM).

Les tests d'immunoréactivité sur cellules ont conduit à une IRF assez faible, de l'ordre de 50%. Toutefois ces résultats ne sont que préliminaires. En effet, l'influence de l'encombrement des groupements DFO sur l'affinité de l'Ac a été étudiée dans une étude sur la chélation du trastuzumab avec le DFO.¹²⁹ Dans cette étude, l'immunoréactivité diminue en fonction des ratio molaire, mais avec le ratio Ac-DFO 1:10, elle reste proche de 90% et avec le ratio 1:60 elle est de 80%.

Les conditions du protocole de binding nécessitent encore des optimisations. En effet, la liaison non spécifique étant supérieure à la liaison spécifique, on peut penser que la quantité d'Ag sur les cellules est relativement faible. Il serait intéressant d'augmenter l'expression antigénique en augmentant le nombre de cellules par puit ou en activant l'expression antigénique les cellules. De plus, notre méthode de séparation du surnageant et du culot cellulaire, suite à l'incubation des cellules avec l'Ac chaud, est à optimiser. En effet, une séparation par collecteur d'échantillon sur membrane et rinçage pourrait permettre de diminuer la liaison non spécifique par rapport à la technique de centrifugation utilisée.¹³¹

Un autre facteur qui pourrait intervenir dans la diminution de l'immunoréactivité est l'utilisation du DMSO dans la préparation du DFO qui pourrait, malgré sa faible concentration, atteindre l'intégrité de l'Ac. Pour tester cette hypothèse, nous pourrions réaliser deux chélation en parallèle, l'une utilisant du DMSO, l'autre du HCl pour la préparation du chélatant, et à la suite du radiomarquage, comparer l'immunoréactivité des deux conditions.

Nous ne pouvons pas écarter l'hypothèse qu'il existe une fixation du ligand sur le site de reconnaissance de l'antigène (CDR) due à la présence de lysines au niveau du CDR. En effet, en se fixant sur ces sites, le ligand pourrait entraîner un encombrement et une perturbation de la liaison antigène-Ac. Il est donc primordial de poursuivre nos études de binding avec d'autres conditions et une fois le protocole optimisé, tester les

différents Ac et ratios étudiés. Dans un second temps, nous étudierons les Ac radiomarqués au ^{64}Cu .

En vue des études d'imagerie *in vivo*, il a été nécessaire de radiomarquer également l'Ac anti-IL6mR. En effet, lors d'études *in vitro* sur des cellules murines, il a été démontré que le tocilizumab n'inhibait pas la voie de signalisation de l'interleukine 6¹²⁴. L'Ac anti-IL-6mR étant disponible en faible quantité, nous avons effectué les mises au point du radiomarquage sur les deux Ac commerciaux humains, le tocilizumab et le pavilizumab, qui sont de mêmes isotopes (IgG1). Lors du radiomarquage de l'Ac anti-IL-6mR, nous n'avons pas réussi à obtenir d'aussi bonnes PRC qu'avec les deux autres Ac : (Ac 2mg DFO 1:10 : 89,6 % pour 0,25 mg versus 96,4 % pour 0,5 mg). Ce problème peut s'expliquer par les petites quantité d'Ac utilisées dès l'étape de chélation pouvant entraîner une perte importante d'Ac par adsorption sur les tubes et les filtres de purification, malgré les précautions prises dans le matériel choisi. D'autre part, parmi les excipients de cet Ac murin, de la gélatine était présente en quantité non négligeable et qui, compte tenu de son poids moléculaire (du même ordre de grandeur que celui de l'Ac), ne pouvait être séparé malgré des étapes de transfert de tampon. La gélatine comportant des groupements NH_2 libre, il est possible qu'elle ait également été radiomarquée en même temps que l'Ac. Pour s'assurer qu'il n'y a pas eu d'interférence un Western Blot, après radiomarquage, pourrait être réalisé. Le radiomarquage d'un Ac anti-IL-6mR d'un autre fournisseur serait également envisageable.

Pour étudier la PR, le modèle choisi est le modèle murin CIA, qui est le plus utilisé dans les études *in vivo*. L'immunisation des souris a permis d'obtenir des lésions arthritiques de différents stades. Les premiers signes inflammatoires au niveau distal apparaissent entre J21 et J25 après la première injection. Nous avons choisi de travailler à partir de J56 pour se placer à un stade de lésions assez importantes en émettant l'hypothèse que la fixation de l'Ac anti-IL6mR serait favorisée.

A J57, l'imagerie au ^{18}F -FDG des souris CIA et des souris contrôles a été réalisée, 1h post-injection. L'étude de la fixation du ^{18}F -FDG se base la comparaison du rapport des VOI de chaque patte sur le VOI du coeur de la souris correspondante afin de pouvoir comparer les souris entre elles. Aucune différence significative de fixation du ^{18}F -FDG n'a été observée entre les souris CIA et les souris SHAM, ni de différence de

fixation en fonction du score. La fixation non significative du ^{18}F -FDG au niveau des pattes des souris CIA pourrait être liée à une acquisition trop tardive par à l'administration du radiotraceur.¹³² En effet, une étude a montré qu'après réalisation d'une imagerie TEP 30min post-injection du ^{18}F -FDG chez des souris CIA, une corrélation, entre la fixation du ^{18}F -FDG et la sévérité des lésions mesurée par histologie, était visible. Cette absence de différence peut également être expliquée par une imagerie trop tardive par rapport à l'immunisation. Dans l'étude de Wang et al. 2019, une imagerie TEP 1h post-injection du ^{18}F -FDG chez des rats CIA a montré une fixation plus élevée à J23 post immunisation qu'à J40. Une absence de corrélation avec le stade arthritique a également été observé dans cette même étude : la fixation du ^{18}F -FDG de rats ayant un score de 3 était inférieure à celle des rats CIA ayant un score de 2, sans explication à ce phénomène.

Lors de l'étude des Ac radiomarqués au ^{89}Zr , une fixation au niveau des pattes de l'Ac ^{89}Zr -anti-IL-6mR a été observée, mais elle a également été retrouvée avec l'Ac contrôle. On peut donc se demander dans quelle mesure cette fixation est spécifique et si elle n'est pas plus en lien avec l'inflammation et l'œdème au niveau distal. Les études *in vivo* ont permis de confirmer la stabilité du radiomarquage devant la faible fixation sur les épiphyses des os, zones sur lesquelles le Zr^{4+} libre est susceptible de s'accumuler.

Une fixation rénale corticale très importante de l'Ac anti-IL-6mR a été mise en évidence aussi bien chez les souris CIA que les souris SHAM. Cette fixation pourrait être due à l'expression connue du récepteur à l'IL6 au niveau de la corticale des reins¹³³. Toutefois, l'hypothèse d'un radiomarquage de la gélatine présente avec l'Ac anti-IL6mR pourrait aussi participer à la fixation observée dans le néphron.

Ces expériences *in vivo* seront à renouveler afin d'approfondir l'étude de biodistribution d'un anti-IL-6mR radiomarqué au ^{89}Zr , à l'aide d'un nouvel Ac provenant d'un autre fournisseur, ne contenant pas de gélatine. Toutefois, à cause de sa forme libre, le ^{89}Zr n'est pas le radioélément idéal pour notre modèle murin de PR. C'est pourquoi, il sera très intéressant de réaliser également ces expériences avec l'Ac radiomarqué au ^{64}Cu .

Conclusion-Perspectives

Dans cette thèse, nous avons présenté la mise au point du radiomarquage d'Ac au ^{89}Zr et au ^{64}Cu . L'objectif était de disposer d'outils diagnostic pour l'immunoTEP. Dans le cadre de la preuve de concept, nous avons évalué *in vivo*, le potentiel diagnostic de l'Ac anti-IL6mR, dans un modèle murin de PR.

Lors de la première étape de ce travail, nous avons optimisé les conditions de radiomarquage des Ac au ^{89}Zr et au ^{64}Cu avec de très bons rendements de marquage (> 95%) et une bonne répétabilité. Le radiomarquage était stable *in vitro* dans le milieu réactionnel, dans le sérum physiologique et dans le sérum humain.

Nous avons de plus évalué l'affinité du tocilizumab et de l'atézolizumab radiomarqués au ^{89}Zr vis-à-vis de leur cible. Toutefois, ces expériences de binding nécessiteront d'être optimisées pour préciser et confirmer que l'Ac ne perde pas en affinité et en immunoréactivité pour l'Ag. Elles devront être également réalisées avec les Ac radiomarqués au ^{64}Cu .

Pour finir, nous avons étudié l'Ac ciblant le récepteur murin à l'IL6 radiomarqué au ^{89}Zr dans un modèle de PR. La stabilité du marquage *in vivo* a été confirmée et nous avons pu observer la biodistribution de l'Ac radiomarqué sur 5 jours. Des études supplémentaires sont toutefois nécessaires pour valider l'intérêt de l'Ac anti-IL-6R dans la PR, voir dans d'autres maladies inflammatoires. De plus, nous étudierons par la suite la biodistribution de l'atézolizumab radiomarqué et son intérêt dans un modèle murin de cancer.

En conclusion, au cours de ces dernières années, l'immuno-PET s'est imposée comme un outil prometteur pour la médecine personnalisée dans le contexte de stratégies de traitements multimodales. Notre travail s'inscrit dans la volonté de développer un nouvel outil diagnostique voir théranostique, qui pourrait être développé dans de multiples indications, et en particulier dans le domaine de l'oncologie et des maladies inflammatoires, pathologies dans lesquelles les Ac sont au cœur de la prise en charge des patients.

Serment de Galien

En présence des Maitres de la Faculté, je fais le serment :

- D'honorer ceux qui m'ont instruit(e) dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle aux principes qui m'ont été enseignés et d'actualiser mes connaissances

- D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de Déontologie, de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;

- De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers la personne humaine et sa dignité

- En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

- De ne dévoiler à personne les secrets qui m'auraient été confiés ou dont j'aurais eu connaissance dans l'exercice de ma profession

- De faire preuve de loyauté et de solidarité envers mes collègues pharmaciens

- De coopérer avec les autres professionnels de santé

Que les Hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert(e) d'opprobre et méprisé(e) de mes confrères si j'y manque.

Bibliographie

1. Schroeder, H. W. & Cavacini, L. Structure and function of immunoglobulins. *J. Allergy Clin. Immunol.* **125**, S41-52 (2010).
2. Guéry, H. C. Radiomarquage au ^{99m}Tc des IgA et IgG : optimisation du marquage, étude in vitro, biodistribution chez l'animal sain et sur modèle tumoral. (2015).
3. Chiu, M. L., Goulet, D. R., Teplyakov, A. & Gilliland, G. L. Antibody Structure and Function: The Basis for Engineering Therapeutics. *Antibodies* **8**, 55 (2019).
4. Beck, A., Goetsch, L., Dumontet, C. & Corvaia, N. Strategies and challenges for the next generation of antibody-drug conjugates. *Nat. Rev. Drug Discov.* **16**, 315–337 (2017).
5. Deisenhofer, J. Crystallographic refinement and atomic models of a human Fc fragment and its complex with fragment B of protein A from *Staphylococcus aureus* at 2.9- and 2.8-Å resolution. *Biochemistry* **20**, 2361–2370 (1981).
6. Rouard, H. *et al.* Fc receptors as targets for immunotherapy. *Int. Rev. Immunol.* **16**, 147–185 (1997).
7. Golay, J., Andrea, A. E. & Cattaneo, I. Role of Fc Core Fucosylation in the Effector Function of IgG1 Antibodies. *Front. Immunol.* **13**, 929895 (2022).
8. Goulet, D. R. & Atkins, W. M. Considerations for the Design of Antibody-Based Therapeutics. *J. Pharm. Sci.* **109**, 74–103 (2020).
9. Arnold, J. N., Wormald, M. R., Sim, R. B., Rudd, P. M. & Dwek, R. A. The impact of glycosylation on the biological function and structure of human immunoglobulins. *Annu. Rev. Immunol.* **25**, 21–50 (2007).
10. Posner, J., Barrington, P., Brier, T. & Datta-Mannan, A. Monoclonal Antibodies: Past, Present and Future. in *Concepts and Principles of Pharmacology* (eds. Barrett, J. E., Page, C. P. & Michel, M. C.) vol. 260 81–141 (Springer International Publishing, 2019).
11. Lu, R.-M. *et al.* Development of therapeutic antibodies for the treatment of diseases. *J. Biomed. Sci.* **27**, 1 (2020).
12. Morrison, S. L., Johnson, M. J., Herzenberg, L. A. & Oi, V. T. Chimeric human antibody molecules: mouse antigen-binding domains with human constant region domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **81**, 6851–6855 (1984).
13. Siberil, S., Dutertre, C.-A., Boix, C. & Teillaud, J.-L. [Therapeutic monoclonal antibodies: a little history, a lot of engineering, and... some clinical successes]. *Transfus. Clin. Biol. J. Soc. Française Transfus. Sang.* **12**, 114–122 (2005).
14. Jones, P. T., Dear, P. H., Foote, J., Neuberger, M. S. & Winter, G. Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse. *Nature* **321**, 522–525 (1986).
15. Roguska, M. A. *et al.* Humanization of murine monoclonal antibodies through variable domain resurfacing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 969–973 (1994).
16. Lonberg, N. *et al.* Antigen-specific human antibodies from mice comprising four distinct genetic modifications. *Nature* **368**, 856–859 (1994).
17. Schwaber, J. & Cohen, E. P. Human x mouse somatic cell hybrid clone secreting immunoglobulins of both parental types. *Nature* **244**, 444–447 (1973).
18. Kaplon, H., Crescioli, S., Chenoweth, A., Visweswaraiyah, J. & Reichert, J. M. Antibodies to watch in 2023. *mAbs* **15**, 2153410.
19. Wang, X., Mathieu, M. & Brezski, R. J. IgG Fc engineering to modulate antibody effector functions. *Protein Cell* **9**, 63–73 (2018).
20. Lazar, G. A. *et al.* Engineered antibody Fc variants with enhanced effector function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 4005–4010 (2006).
21. Richards, J. O. *et al.* Optimization of antibody binding to FcγRIIIa enhances macrophage phagocytosis of tumor cells. *Mol. Cancer Ther.* **7**, 2517–2527 (2008).

22. Pelegrin, M. *et al.* Immunotherapy of a Viral Disease by *in Vivo* Production of Therapeutic Monoclonal Antibodies. *Hum. Gene Ther.* **11**, 1407–1415 (2000).
23. Olafsen, T. & Wu, A. M. Novel Antibody Vectors for Imaging. *Semin. Nucl. Med.* **40**, 167–181 (2010).
24. Hu, S. *et al.* Minibody: A novel engineered anti-carcinoembryonic antigen antibody fragment (single-chain Fv-CH3) which exhibits rapid, high-level targeting of xenografts. *Cancer Res.* **56**, 3055–3061 (1996).
25. Olafsen, T. *et al.* ImmunoPET imaging of B-cell lymphoma using 124I-anti-CD20 scFv dimers (diabodies). *Protein Eng. Des. Sel. PEDS* **23**, 243–249 (2010).
26. Frontiers | Single-Domain Antibodies As Therapeutics against Human Viral Diseases. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2017.01802/full>.
27. Weisser, N. E. & Hall, J. C. Applications of single-chain variable fragment antibodies in therapeutics and diagnostics. *Biotechnol. Adv.* **27**, 502–520 (2009).
28. Labrijn, A. F., Janmaat, M. L., Reichert, J. M. & Parren, P. W. H. I. Bispecific antibodies: a mechanistic review of the pipeline. *Nat. Rev. Drug Discov.* **18**, 585–608 (2019).
29. Barbet, J. *et al.* La radio-immunothérapie préciblée des tumeurs solides : une démarche pluridisciplinaire. *Médecine Nucl.* **31**, 498–505 (2007).
30. Carosella, E. D., Aujame, L. & Carcagne, J. Modification des anticorps monoclonaux, immuno-ligands : applications et perspectives. *Immuno-Anal. Biol. Spéc.* **5**, 9–19 (1990).
31. Heiss, M. M. *et al.* The trifunctional antibody catumaxomab for the treatment of malignant ascites due to epithelial cancer: Results of a prospective randomized phase II/III trial. *Int. J. Cancer* **127**, 2209–2221 (2010).
32. Zhu, Y., Wang, S. S., Zhou, Z. S. & Ho, M. The emergence of AntibodyPlus: the future trend of antibody-based therapeutics. *Antib. Ther.* **5**, 280–287 (2022).
33. Baty, D. & Chames, P. Le point sur les anticorps autorisés en imagerie et en immunothérapie. *Immuno-Anal. Biol. Spéc.* **21**, 255–263 (2006).
34. Paintaud, G. [Pharmacokinetics (PK) of mAbs]. *Med. Sci. MS* **25**, 1057–1062 (2009).
35. Wang, W., Wang, E. Q. & Balthasar, J. P. Monoclonal antibody pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Clin. Pharmacol. Ther.* **84**, 548–558 (2008).
36. Yokota, T., Milenic, D. E., Whitlow, M. & Schlom, J. Rapid tumor penetration of a single-chain Fv and comparison with other immunoglobulin forms. *Cancer Res.* **52**, 3402–3408 (1992).
37. Yang, K. *et al.* Tailoring structure-function and pharmacokinetic properties of single-chain Fv proteins by site-specific PEGylation. *Protein Eng.* **16**, 761–770 (2003).
38. Vivier, D., Sharma, S. K. & Zeglis, B. M. Understanding the In Vivo Fate of Radioimmunoconjugates for PET and SPECT. *J. Label. Compd. Radiopharm.* **61**, 672–692 (2018).
39. Baselga, J. The EGFR as a target for anticancer therapy--focus on cetuximab. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl. 1990* **37 Suppl 4**, S16-22 (2001).
40. Hoffmann, T. K., Meidenbauer, N., Dworacki, G., Kanaya, H. & Whiteside, T. L. Generation of tumor-specific T-lymphocytes by cross-priming with human dendritic cells ingesting apoptotic tumor cells. *Cancer Res.* **60**, 3542–3549 (2000).
41. Tsao, L.-C., Force, J. & Hartman, Z. C. Mechanisms of Therapeutic Antitumor Monoclonal Antibodies. *Cancer Res.* **81**, 4641–4651 (2021).
42. Shen, J. & Zhu, Z. Catumaxomab, a rat/murine hybrid trifunctional bispecific monoclonal antibody for the treatment of cancer. *Curr. Opin. Mol. Ther.* **10**, 273–284 (2008).
43. Pallardy, M. [Toxic effects and use of therapeutic monoclonal antibodies]. *Med. Sci. MS* **25**, 1130–1134 (2009).
44. Beck, K. E. *et al.* Enterocolitis in patients with cancer after antibody blockade of cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **24**,

2283–2289 (2006).

45. Hansel, T. T., Kropshofer, H., Singer, T., Mitchell, J. A. & George, A. J. T. The safety and side effects of monoclonal antibodies. *Nat. Rev. Drug Discov.* **9**, 325–338 (2010).

46. Balduzzi, S. *et al.* Trastuzumab-containing regimens for metastatic breast cancer. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2014**, CD006242 (2014).

47. Ternant, D. & Pintaud, G. Pharmacokinetics and concentration-effect relationships of therapeutic monoclonal antibodies and fusion proteins. *Expert Opin. Biol. Ther.* **5 Suppl 1**, S37-47 (2005).

48. Ng, C. M., Bruno, R., Combs, D. & Davies, B. Population pharmacokinetics of rituximab (anti-CD20 monoclonal antibody) in rheumatoid arthritis patients during a phase II clinical trial. *J. Clin. Pharmacol.* **45**, 792–801 (2005).

49. Bendtzen, K. *et al.* Individualized monitoring of drug bioavailability and immunogenicity in rheumatoid arthritis patients treated with the tumor necrosis factor alpha inhibitor infliximab. *Arthritis Rheum.* **54**, 3782–3789 (2006).

50. Papanastasiou, G. *et al.* Multimodality quantitative assessments of myocardial perfusion using dynamic contrast enhanced magnetic resonance and 15O-labelled water positron emission tomography imaging. *IEEE Trans. Radiat. Plasma Med. Sci.* **2**, 259–271 (2018).

51. Bensch, F. *et al.* 89Zr-atezolizumab imaging as a non-invasive approach to assess clinical response to PD-L1 blockade in cancer. *Nat. Med.* **24**, 1852–1858 (2018).

52. Jadvar, H. Is There Use for FDG-PET in Prostate Cancer? *Semin. Nucl. Med.* **46**, 502–506 (2016).

53. Liu, Y. The Place of FDG PET/CT in Renal Cell Carcinoma: Value and Limitations. *Front. Oncol.* **6**, 201 (2016).

54. Bailly, C. *et al.* Immuno-PET for Clinical Theranostic Approaches. *Int. J. Mol. Sci.* **18**, 57 (2016).

55. Bodet-Milin, C. *et al.* Clinical Results in Medullary Thyroid Carcinoma Suggest High Potential of Pretargeted Immuno-PET for Tumor Imaging and Theranostic Approaches. *Front. Med.* **6**, 124 (2019).

56. Rodriguez, C., Delaney, S., Sarrett, S. M., Keinänen, O. M. & Zeglis, B. M. Antibody Engineering for Nuclear Imaging and Radioimmunotherapy. *J. Nucl. Med.* **63**, 1316 (2022).

57. Sarda, L. *et al.* Myocarditis in patients with clinical presentation of myocardial infarction and normal coronary angiograms. *J. Am. Coll. Cardiol.* **37**, 786–792 (2001).

58. Ivančević, V., Perka, C., Hasart, O., Sandrock, D. & Munz, D. L. Imaging of low-grade bone infection with a technetium-99m labelled monoclonal anti-NCA-90 Fab' fragment in patients with previous joint surgery. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **29**, 547–551 (2002).

59. Behr, T., Becker, W., Hannappel, E., Goldenberg, D. M. & Wolf, F. Targeting of liver metastases of colorectal cancer with IgG, F(ab')₂, and Fab' anti-carcinoembryonic antigen antibodies labeled with 99mTc: the role of metabolism and kinetics. *Cancer Res.* **55**, 5777s–5785s (1995).

60. Straka, M. R., Joyce, J. M. & Myers, D. T. Tc-99m nofetumomab merpentan complements an equivocal bone scan for detecting skeletal metastatic disease from lung cancer. *Clin. Nucl. Med.* **25**, 54–55 (2000).

61. Murphy, G. P., Snow, P. B., Brandt, J., Elgamal, A. & Brawer, M. K. Evaluation of prostate cancer patients receiving multiple staging tests, including ProstaScint scintiscans. *The Prostate* **42**, 145–149 (2000).

62. Culy, C. R. & Lamb, H. M. 131I tositumomab. *BioDrugs Clin. Immunother. Biopharm. Gene Ther.* **14**, 195–202 (2000).

63. Krasner, C. & Joyce, R. M. Zevalin: 90yttrium labeled anti-CD20 (ibritumomab tiuxetan), a new treatment for non-Hodgkin's lymphoma. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **2**, 341–

349 (2001).

64. Parakh, S., Lee, S. T., Gan, H. K. & Scott, A. M. Radiolabeled Antibodies for Cancer Imaging and Therapy. *Cancers* **14**, 1454 (2022).
65. Lindström, L. S. *et al.* Clinically used breast cancer markers such as estrogen receptor, progesterone receptor, and human epidermal growth factor receptor 2 are unstable throughout tumor progression. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **30**, 2601–2608 (2012).
66. Ulaner, G. A., Hyman, D. M., Lyashchenko, S. K., Lewis, J. S. & Carrasquillo, J. A. ⁸⁹Zr-trastuzumab PET/CT for detection of HER2-positive metastases in patients with HER2-negative primary breast cancer. *Clin. Nucl. Med.* **42**, 912–917 (2017).
67. Kurihara, H. *et al.* (⁶⁴Cu)-DOTA-trastuzumab PET imaging and HER2 specificity of brain metastases in HER2-positive breast cancer patients. *EJNMMI Res.* **5**, 8 (2015).
68. Velikyán, I. *et al.* Diagnostic HER2-binding radiopharmaceutical, [⁶⁸Ga]Ga-ABY-025, for routine clinical use in breast cancer patients. *Am. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **9**, 12–23 (2019).
69. Kostine, M., Marabelle, A., Schaefferbeke, T. & Kfoury, M. Les limites des inhibiteurs de points de contrôle immunitaire et la gestion de leur toxicité. *médecine/sciences* **35**, 949–956 (2019).
70. Ribas, A. & Wolchok, J. D. Cancer immunotherapy using checkpoint blockade. *Science* **359**, 1350–1355 (2018).
71. Passiglia, F. *et al.* Efficacy of nivolumab in pre-treated non-small-cell lung cancer patients harbouring KRAS mutations. *Br. J. Cancer* **120**, 57–62 (2019).
72. Martins, F. *et al.* Adverse effects of immune-checkpoint inhibitors: epidemiology, management and surveillance. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **16**, 563–580 (2019).
73. Moroz, A. *et al.* A Preclinical Assessment of ⁸⁹Zr-atezolizumab Identifies a Requirement for Carrier Added Formulations Not Observed with ⁸⁹Zr-C4. *Bioconjug. Chem.* **29**, 3476–3482 (2018).
74. Truillet, C. *et al.* Imaging PD-L1 Expression with ImmunoPET. *Bioconjug. Chem.* **29**, 96–103 (2018).
75. Vento, J. *et al.* PD-L1 detection using ⁸⁹Zr-atezolizumab immuno-PET in renal cell carcinoma tumorgrafts from a patient with favorable nivolumab response. *J. Immunother. Cancer* **7**, 144 (2019).
76. Wen, X. *et al.* Immuno-SPECT/PET imaging with radioiodinated anti-PD-L1 antibody to evaluate PD-L1 expression in immune-competent murine models and PDX model of lung adenocarcinoma. *Nucl. Med. Biol.* **86–87**, 44–51 (2020).
77. Lesniak, W. G. *et al.* PD-L1 Detection in Tumors Using [⁶⁴Cu]Atezolizumab with PET. *Bioconjug. Chem.* **27**, 2103–2110 (2016).
78. González Trotter, D. E. *et al.* In Vivo Imaging of the Programmed Death Ligand 1 by ¹⁸F PET. *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.* **58**, 1852–1857 (2017).
79. Sharma, G. *et al.* Immuno-PET Imaging of Tumour PD-L1 Expression in Glioblastoma. *Cancers* **15**, 3131 (2023).
80. van de Donk, P. P. *et al.* Molecular imaging biomarkers for immune checkpoint inhibitor therapy. *Theranostics* **10**, 1708–1718 (2020).
81. Narazaki, M., Tanaka, T. & Kishimoto, T. The role and therapeutic targeting of IL-6 in rheumatoid arthritis. *Expert Rev. Clin. Immunol.* **13**, 535–551 (2017).
82. Aletaha, D. *et al.* Consensus statement on blocking interleukin-6 receptor and interleukin-6 in inflammatory conditions: an update. *Ann. Rheum. Dis.* **82**, 773–787 (2023).
83. Smolen, J. S. *et al.* Effect of interleukin-6 receptor inhibition with tocilizumab in patients with rheumatoid arthritis (OPTION study): a double-blind, placebo-controlled, randomised trial. *The Lancet* **371**, 987–997 (2008).
84. Nishimoto, N. *et al.* Mechanisms and pathologic significances in increase in serum

- interleukin-6 (IL-6) and soluble IL-6 receptor after administration of an anti-IL-6 receptor antibody, tocilizumab, in patients with rheumatoid arthritis and Castleman disease. *Blood* **112**, 3959–3964 (2008).
85. Camacho, X. *et al.* 99mTechnetium- or Cy7-Labeled Fab(Tocilizumab) as Potential Multiple Myeloma Imaging Agents. *Anticancer Agents Med. Chem.* **21**, 1883–1893 (2021).
 86. Camacho, X. *et al.* Tocilizumab Labeling with 99mTechnetium via HYNIC as a Molecular Diagnostic Agent for Multiple Myeloma. *Anticancer Agents Med. Chem.* **17**, 1267–1277 (2017).
 87. Sugimoto, K., Nishimoto, N., Kishimoto, T., Yoshizaki, K. & Nishimura, T. Imaging of lesions in a murine rheumatoid arthritis model with a humanized anti-interleukin-6 receptor antibody. *Ann. Nucl. Med.* **19**, 261–266 (2005).
 88. Narazaki, M. & Kishimoto, T. Current status and prospects of IL-6-targeting therapy. *Expert Rev. Clin. Pharmacol.* **15**, 575–592 (2022).
 89. Bernhard, C. Synthèse d'agents chélatants bifonctionnels macrocycliques pour le marquage de molécules biologiques par des métaux : application en imagerie médicale. (Dijon, 2011).
 90. Camera, L. *et al.* Evaluation of the serum stability and in vivo biodistribution of CHX-DTPA and other ligands for yttrium labeling of monoclonal antibodies. *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.* **35**, 882–889 (1994).
 91. Morais, M. & Ma, M. T. Site-specific chelator-antibody conjugation for PET and SPECT imaging with radiometals. *Drug Discov. Today Technol.* **30**, 91–104 (2018).
 92. Rana, T. M. & Meares, C. F. N-terminal modification of immunoglobulin polypeptide chains tagged with isothiocyanato chelates. *Bioconjug. Chem.* **1**, 357–362 (1990).
 93. Schumacher, D., Helma, J., Schneider, A. F. L., Leonhardt, H. & Hackenberger, C. P. R. Nanobodies: Chemical Functionalization Strategies and Intracellular Applications. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **57**, 2314–2333 (2018).
 94. Adumeau, P., Davydova, M. & Zeglis, B. M. Thiol-Reactive Bifunctional Chelators for the Creation of Site-Selectively Modified Radioimmunoconjugates with Improved Stability. *Bioconjug. Chem.* **29**, 1364–1372 (2018).
 95. Wei, W. *et al.* ImmunoPET: Concept, Design, and Applications. *Chem. Rev.* **120**, 3787–3851 (2020).
 96. Baskin, J. M. & Bertozzi, C. R. Bioorthogonal Click Chemistry: Covalent Labeling in Living Systems. *QSAR Comb. Sci.* **26**, 1211–1219 (2007).
 97. Bass, L. A., Wang, M., Welch, M. J. & Anderson, C. J. In vivo transchelation of copper-64 from TETA-octreotide to superoxide dismutase in rat liver. *Bioconjug. Chem.* **11**, 527–532 (2000).
 98. Bailly, C. *et al.* What is the Best Radionuclide for Immuno-PET of Multiple Myeloma? A Comparison Study Between 89Zr- and 64Cu-Labeled Anti-CD138 in a Preclinical Syngeneic Model. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 2564 (2019).
 99. Abou, D. S., Ku, T. & Smith-Jones, P. M. In vivo biodistribution and accumulation of 89Zr in mice. *Nucl. Med. Biol.* **38**, 675–681 (2011).
 100. Jones-Wilson, T. M. *et al.* The in vivo behavior of copper-64-labeled azamacrocyclic complexes. *Nucl. Med. Biol.* **25**, 523–530 (1998).
 101. Kinetic Inertness and Electrochemical Behavior of Copper(II) Tetraazamacrocyclic Complexes: Possible Implications for in Vivo Stability - Woodin - 2005 - European Journal of Inorganic Chemistry - Wiley Online Library. <https://chemistry-europe.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/ejic.200500579>.
 102. La, M. T., Tran, V. H. & Kim, H.-K. Progress of Coordination and Utilization of Zirconium-89 for Positron Emission Tomography (PET) Studies. *Nucl. Med. Mol. Imaging* **53**, 115–124 (2019).

103. Wadas, T. J., Wong, E. H., Weisman, G. R. & Anderson, C. J. Copper chelation chemistry and its role in copper radiopharmaceuticals. *Curr. Pharm. Des.* **13**, 3–16 (2007).
104. Omara, H. M., Hassan, K. F., Kandil, S. A., Hegazy, F. E. & Saleh, Z. A. Proton induced reactions on ⁸⁹Y with particular reference to the production of the medically interesting radionuclide ⁸⁹Zr. *Rca - Radiochim. Acta* **97**, 467–471 (2009).
105. Bhatt, N. B., Pandya, D. N. & Wadas, T. J. Recent Advances in Zirconium-89 Chelator Development. *Mol. J. Synth. Chem. Nat. Prod. Chem.* **23**, 638 (2018).
106. Deri, M. A., Zeglis, B. M., Francesconi, L. C. & Lewis, J. S. PET Imaging with ⁸⁹Zr: From Radiochemistry to the Clinic. *Nucl. Med. Biol.* **40**, 3–14 (2013).
107. Bhatt, N. B., Pandya, D. N. & Wadas, T. J. Recent Advances in Zirconium-89 Chelator Development. *Mol. J. Synth. Chem. Nat. Prod. Chem.* **23**, 638 (2018).
108. Pandya, D. N. *et al.* Polyazamacrocyclic Ligands Facilitate ⁸⁹Zr Radiochemistry and Yield ⁸⁹Zr Complexes with Remarkable Stability. *Inorg. Chem.* **59**, 17473–17487 (2020).
109. Verel, I. *et al.* ⁸⁹Zr immuno-PET: comprehensive procedures for the production of ⁸⁹Zr-labeled monoclonal antibodies. *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.* **44**, 1271–1281 (2003).
110. Vosjan, M. J. W. D. *et al.* Conjugation and radiolabeling of monoclonal antibodies with zirconium-89 for PET imaging using the bifunctional chelate p-isothiocyanatobenzyl-desferrioxamine. *Nat. Protoc.* **5**, 739–743 (2010).
111. Patra, M. *et al.* An octadentate bifunctional chelating agent for the development of stable zirconium-89 based molecular imaging probes. *Chem. Commun. Camb. Engl.* **50**, 11523–11525 (2014).
112. Vugts, D. J. *et al.* Comparison of the octadentate bifunctional chelator DFO*-pPhe-NCS and the clinically used hexadentate bifunctional chelator DFO-pPhe-NCS for ⁸⁹Zr-immuno-PET. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **44**, 286–295 (2017).
113. Feiner, I. V. J. *et al.* The Race for Hydroxamate-Based Zirconium-89 Chelators. *Cancers* **13**, 4466 (2021).
114. Linder, M. C. & Hazegh-Azam, M. Copper biochemistry and molecular biology. *Am. J. Clin. Nutr.* **63**, 797S-811S (1996).
115. Inesi, G. Molecular features of copper binding proteins involved in copper homeostasis. *IUBMB Life* **69**, 211–217 (2017).
116. Meares, C. F. *et al.* Conjugation of antibodies with bifunctional chelating agents: isothiocyanate and bromoacetamide reagents, methods of analysis, and subsequent addition of metal ions. *Anal. Biochem.* **142**, 68–78 (1984).
117. Fujibayashi, Y. *et al.* Copper-62-ATSM: a new hypoxia imaging agent with high membrane permeability and low redox potential. *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.* **38**, 1155–1160 (1997).
118. Pasquali, M. *et al.* Copper-64 based radiopharmaceuticals for brain tumors and hypoxia imaging. *Q. J. Nucl. Med. Mol. Imaging Off. Publ. Ital. Assoc. Nucl. Med. AIMN Int. Assoc. Radiopharmacol. IAR Sect. Soc. Of* **64**, 371–381 (2020).
119. Tosato, M. *et al.* Chelation of Theranostic Copper Radioisotopes with S-Rich Macrocycles: From Radiolabelling of Copper-64 to In Vivo Investigation. *Molecules* **27**, 4158 (2022).
120. Mirick, G. R. *et al.* Transfer of copper from a chelated ⁶⁷Cu-antibody conjugate to ceruloplasmin in lymphoma patients. *Nucl. Med. Biol.* **26**, 841–845 (1999).
121. Cooper, M. S. *et al.* Comparison of ⁶⁴Cu-Complexing Bifunctional Chelators for Radioimmunoconjugation: Labeling Efficiency, Specific Activity, and *in Vitro* / *in Vivo* Stability. *Bioconjug. Chem.* **23**, 1029–1039 (2012).
122. Boros, E. & Holland, J. P. Chemical aspects of metal ion chelation in the synthesis and application antibody-based radiotracers. *J. Label. Compd. Radiopharm.* **61**, 652–671 (2018).

123. Heroux, K. J. *et al.* The long and short of it: the influence of N-carboxyethyl versus N-carboxymethyl pendant arms on in vitro and in vivo behavior of copper complexes of cross-bridged tetraamine macrocycles. *Dalton Trans. Camb. Engl.* 2003 2150–2162 (2007) doi:10.1039/b702938a.
124. Lokau, J. *et al.* Tocilizumab does not block interleukin-6 (IL-6) signaling in murine cells. *PLOS ONE* **15**, e0232612 (2020).
125. Brand, D. D., Latham, K. A. & Rosloniec, E. F. Collagen-induced arthritis. *Nat. Protoc.* **2**, 1269–1275 (2007).
126. Navarro, A.-S. *et al.* TE1PA as Innovating Chelator for ⁶⁴Cu Immuno-TEP Imaging: A Comparative in Vivo Study with DOTA/NOTA by Conjugation on 9E7.4 mAb in a Syngeneic Multiple Myeloma Model. *Bioconjug. Chem.* **30**, 2393–2403 (2019).
127. Brady, E. D., Chong, H.-S., Milenic, D. E. & Brechbiel, M. W. Development of a spectroscopic assay for bifunctional ligand-protein conjugates based on copper. *Nucl. Med. Biol.* **31**, 795–802 (2004).
128. Delage, J. A. *et al.* Impact of DOTA Conjugation on Pharmacokinetics and Immunoreactivity of [¹⁷⁷Lu]Lu-1C1m-Fc, an Anti TEM-1 Fusion Protein Antibody in a TEM-1 Positive Tumor Mouse Model. *Pharmaceutics* **13**, 96 (2021).
129. Sharma, S. K. *et al.* A Systematic Evaluation of Antibody Modification and ⁸⁹Zr-Radiolabeling for Optimized Immuno-PET. *Bioconjug. Chem.* **32**, 1177–1191 (2021).
130. Mihara, M., Ohsugi, Y. & Kishimoto, T. Tocilizumab, a humanized anti-interleukin-6 receptor antibody, for treatment of rheumatoid arthritis. *Open Access Rheumatol. Res. Rev.* **3**, 19–29 (2011).
131. Carpenet, H., Cuvillier, A., Monteil, J. & Quelven, I. Anti-CD20 Immunoglobulin G Radiolabeling with a ^{99m}Tc-Tricarbonyl Core: In Vitro and In Vivo Evaluations. *PloS One* **10**, e0139835 (2015).
132. Kundu-Raychaudhuri, S., Mitra, A., Datta-Mitra, A., Chaudhari, A. J. & Raychaudhuri, S. P. In vivo quantification of mouse autoimmune arthritis by PET/CT. *Int. J. Rheum. Dis.* **19**, 452–458 (2016).
133. Lei, C.-T. *et al.* The classic signalling and trans-signalling of interleukin-6 are both injurious in podocyte under high glucose exposure. *J. Cell. Mol. Med.* **22**, 251–260 (2018).

Radiomarquage d'anticorps : de l'état de l'art à la mise au point du radiomarquage d'anticorps au cuivre 64 et au zirconium 89

L'immunothérapie a révolutionné la prise en charge des patients dans le cadre de pathologies cancéreuses, auto-immunes, ou inflammatoires. Face à des réponses cliniques hétérogènes et aux multiples options thérapeutiques disponibles, un enjeu majeur est apparu : personnaliser la prise en charge des patients. Dans cet objectif, les anticorps radiomarqués représentent une solution attractive. L'immunoTEP permet une imagerie spécifique par tomographie par émission de positons en utilisant des anticorps monoclonaux comme vecteur. Dans cette thèse, nous avons élaboré une revue de la littérature allant de l'immunothérapie, à l'immunoTEP et aux techniques de radiochimie du ⁸⁹Zr et du ⁶⁴Cu. Dans un second temps, nous présenterons la mise au point du radiomarquage d'anticorps, le tocilizumab et l'atézolizumab, au ⁸⁹Zr et au ⁶⁴Cu. Cette méthode a permis d'obtenir un radiomarquage des anticorps répétables avec un très bon rendement. Les anticorps radiomarqués se sont révélés stables aussi bien *in vitro* et qu'*in vivo*. Dans le cadre de la preuve de concept, nous avons de plus évalué *in vivo*, le potentiel diagnostique de l'anticorps anti-récepteur murin à l'IL6 dans un modèle murin de polyarthrite rhumatoïde.

Radiolabeling of antibodies: from state of the art to the development of radiolabeling of antibodies with copper 64 and zirconium 89

Immunotherapy has transformed patient care with cancer, autoimmune, or inflammatory diseases. With heterogeneous clinical responses and multiple therapeutic options available, a major challenge has emerged: personalized medicine. Radiolabeled antibodies offer an attractive way for this purpose. ImmunoPET provides specific imaging with positron emission tomography using monoclonal antibodies as vector. In this manuscript, we produced a literature review covering immunotherapy, immunoPET and radiochemistry techniques for ⁸⁹Zr and ⁶⁴Cu. Secondly, we presented radiolabeling optimization of antibodies, tocilizumab and atezolizumab, with ⁸⁹Zr and ⁶⁴Cu. This method enabled us to perform repeatable radiolabelling of antibodies with very high yields. The radiolabeled antibodies are stable *in vitro* and *in vivo*. For proof of concept, we evaluated *in vivo* diagnostic potential of the murine anti-IL6 receptor antibody in a murine model of rheumatoid arthritis.

DISCIPLINE administrative : Diplôme d'Études Spécialisées de Pharmacie
Hospitalière – Radiopharmacie

MOTS-CLES : ImmunoTEP - Radiométaux - Anticorps – Théranostique

INTITULE ET ADRESSE DE L'UFR OU DU LABORATOIRE : Université Paul Sabatier Toulouse III, Faculté de Pharmacie, 35 chemin des Maraîchers, 31062 Toulouse CEDEX**Directeur de thèse** : Madame le Docteur Quelven Isabelle